

Aus der Professur für Tiergesundheit und Tierschutz
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

Entwicklung einer in vitro Methode zur Simulation von Verdauung und Resorption gentechnisch veränderter Pflanzen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Agrarwissenschaften (doctor agriculturae (Dr. agr.))
oder Doktor der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Rostock, 2011

vorgelegt von:

Dipl. Biochem. Andre Kacholdt und Dipl. Ing. agr. Mandy Bruch
aus Rostock

Gutachter:

1. Gutachter:
Prof. Dr. Elmar Mohr, Fachgebiet für Tiergesundheit und Tierschutz,
Universität Rostock
2. Gutachter:
Prof. Dr. Annette Zeyner, Fachgebiet für Ernährungsphysiologie und Tierernährung,
Universität Rostock
3. Gutachter:
Prof. Dr. Dirk Prüfer, Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen,
Universität Münster
4. Gutachter:
Prof. Dr. Manfred Fürll, Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik,
Universität Leipzig

Datum der Einreichung: 28. Oktober 2011

Datum der Verteidigung: 08. Juni 2012

1 Einleitung	10
2 Vorgehensweise dieser Methodenentwicklung	14
3 Theoretische Grundlagen und Literatur	16
3.1 Physiologie der Verdauung.....	16
3.1.1 Grundlagen der in vivo Verdauung.....	16
3.1.1.1 Verdauung in der Maulhöhle.....	17
3.1.1.2 Verdauung im Magen.....	17
3.1.1.3 Verdauung im Dünndarm.....	18
3.1.1.4 Verdauung im Dickdarm.....	20
3.1.2 Grundlagen der in vitro Verdauung	22
3.1.2.1 In vitro Verdauungsmodelle.....	22
3.1.2.2 Enzymaktivitäten.....	24
3.1.2.3 Simulation des Kauvorganges.....	24
3.1.2.4 Simulation der Mundhöhlenverdauung	25
3.1.2.5 Simulation der Magenverdauung	25
3.1.2.6 Simulation der Dünndarmverdauung	26
3.1.2.7 Simulation der Dickdarmverdauung	27
3.2 Physiologie der Resorption	28
3.2.1 Allgemeines	28
3.2.2 Resorption in vivo.....	28
3.2.3 Resorption von intakten Proteinen	29
3.2.4 Stabilität von Proteinen gegen proteolytischen Abbau	30
3.2.5 Resorption von Proteinen und Proteinfragmenten aus GVPs	30
3.2.6 Beeinflussung des Proteintransportes durch verschiedene Inhibitoren	32
3.2.7 Simulation der Resorption in vitro.....	32
3.2.7.1 Simulation durch Zentrifugation	32
3.2.7.2 Simulation durch Dialyse.....	32
3.2.7.3 Ussing-Kammer	33
3.2.7.4 In vitro Resorption von radioaktiv markierten Standards	35
3.3 Analyse der Verdauungssimulation	36
3.3.1 Klassische Methoden	36
3.3.1.1 Weender Futtermittelmittelanalyse	36
3.3.1.2 Verdaulichkeiten (VK).....	37
3.3.2 Molekularbiologische Nachweismethoden	38
3.3.2.1 Elektrophoresen.....	38
3.3.2.2 Immunologische Methoden.....	38
3.4 Charakterisierung der gentechnisch veränderten Pflanzen	39

3.4.1 Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen.....	39
3.4.3. Freisetzung von rekombinanten Proteinen aus genveränderten Pflanzen	41
4 Material und Methoden	42
4.1 Material	42
4.1.1 Pflanzenmaterial	42
4.1.2 Modellproteine.....	43
4.1.2.1 Viruskapsid 60 (VP60).....	43
4.1.2.2 Cholertoxin Untereinheit B (CTB).....	43
4.1.2.3 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	43
4.1.2.4 Cyanophycin (CY)	44
4.1.2.5 Neomycinphosphotransferase II (NPT II).....	44
4.1.3 Futtermischungen.....	44
4.1.3.1 Jungsauenaufzuchtfutter.....	44
4.1.3.2 Mischung mit genetisch veränderten Pflanzen	44
4.2 Methoden.....	45
4.2.1 Charakterisierung von Pflanzenmaterial	45
4.2.1.1 Bestimmung der Flüssigkeitsaufnahme lyophilisierter Pflanzen	45
4.2.1.2 Freisetzung von Protein aus Pflanzen	45
4.2.1.3 Abbau von Proteinen aus Pflanzen.....	46
4.2.2 Aufschlussmethoden	46
4.2.2.1 Lyophilisieren	46
4.2.2.2 Häckseln.....	46
4.2.2.3 Mahlen	46
4.2.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten im Gastrointestinaltrakt des Schweins.....	47
4.2.3.1 Bestimmung der Speichelaktivität.....	47
4.2.3.2 Bestimmung der Pepsinaktivität.....	47
4.2.4 Weender-Analyse.....	47
4.2.4.1 Trockensubstanz (TS)	47
4.2.4.2 Rohasche (RA).....	48
4.2.4.3 SalzsäureUnlöslicheRohAsche (SURA)	48
4.2.4.5 Rohprotein (RP)- bestimmung nach Kjeldahl	48
4.2.4.6 Bestimmung der Rohfaser (RF)	49
4.2.4.7 Bestimmung des Rohfettes (RX).....	49
4.2.4.8 Verdaulichkeiten	50
4.2.5 Methoden zur Analyse der in vitro Verdauung.....	50
4.2.5.1 Gravimetrische Bestimmungen der abgebauten Masse.....	50
4.2.5.2 FACE-PA-Gele (Fluorophore-Assisted-Carbohydrate-Elektrophoresis on PA Gels).....	51
4.2.5.3 Dünnschichtchromatographie.....	52
4.2.5.4 Bestimmung von Triglyceriden.....	52

4.2.5.5 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).....	52
4.2.5.6 ELISA (Enzyme linked immunoabsorbent Assay)	53
4.2.5.7 Western Blot	54
4.2.5.8 Proteinbestimmung nach Bradford.....	56
4.2.5.9 TNBS-Assay	56
4.2.6 Ussing-Kammer Technik	56
4.2.7 Gewebeschnitte / Immunohistochemie	58
4.2.8 Fütterungsversuch	59
4.2.8.1 Tiermaterial	59
4.2.8.2 Futtermittel	60
4.2.8.3 Haltung der Tiere	60
4.2.8.4 Durchgeführte Untersuchungen	60
4.3 Statistik.....	61
5 Ergebnisse	62
5.1 Untersuchung der in vivo Verdauung.....	62
5.1.1 Bestimmung der natürlichen Enzymaktivitäten	62
5.1.1.1 Bestimmung der Speichelamylaseaktivität.....	62
5.1.1.2 Bestimmung der Pepsinaktivität.....	63
5.1.2 Bestimmung des in vivo Abbaus von Futtermitteln.....	63
5.1.2.1 In vivo Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter	63
5.1.2.2 In vivo Abbau von frischen Kartoffeln (Sorte Albatros).....	64
5.2 Untersuchungen zur Verdauung in vitro.....	65
5.2.1 Untersuchung des in vitro Abbaus durch α -Amylase	65
5.2.1.1 Untersuchung der Notwendigkeit der Simulation des Abbaus durch α -Amylase.....	65
5.2.1.2 Einfluss von Einwirkzeit und Enzymkonzentration	66
5.2.2 Bestimmung des Abbaus durch Pepsin und Salzsäure.....	67
5.2.2.1 Zeitliche Stabilität von Pepsin.....	67
5.2.2.2 Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch Pepsin/HCl.....	68
5.2.2.3 Einfluss der Pepsinkonzentration	69
5.2.2.4 Abbau von BSA durch Pepsin/HCl	70
5.2.2.5 Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch mehrmalige Pepsinzugabe	71
5.2.3 Bestimmung des Abbaus durch Pankreatin und Gallenextrakt	71
5.2.3.1 Aufschluss durch Pankreatin und Gallenextrakt	71
5.2.3.2 Qualitativer Nachweis des Fettabbaus	72
5.2.3.3 Quantitativer Nachweis des Fettabbaus	74
5.2.3.4 Bestimmung der Einwirkzeit von Pankreatin Galle mit Trinitrobenzoesäure (TNBS)	74
5.2.4 in vitro Abbau von Futtermitteln	76
5.2.4.1 in vitro Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter.....	76

5.2.4.2 In vitro Abbau von Kartoffeln.....	77
5.3. Untersuchungen am gentechnisch verändertem Pflanzenmaterial	79
5.3.1. Bestimmung des Flüssigkeitsaufnahmevermögens lyophilisierter Kartoffelknollen und Tabakblätter	79
5.3.2. Freisetzung von Proteinen aus gentechnisch veränderten Pflanzen	79
5.3.3. Abbau von Gesamtprotein durch die Enzyme α -Amylase und Pepsin	82
5.3.4. Abbau der Modellproteine	83
5.3.4.1. Unterschiede im Abbau von CTB aus frischem oder lyophilisierten Material	83
5.3.4.2. Abbau von Modellproteinen durch α -Amylase und Pepsin	85
5.3.4.3 Abbau der Modellproteine während der Lagerung.....	86
5.4 Simulation der Resorption	87
5.4.1 Bestimmung des optimalen Darmabschnittes für die Resorption von Proteinen	87
5.4.2 Bestimmung des [3 H]-Manntioltransportes.....	87
5.4.3 Resorption der Modellproteine	88
5.4.4. Spezifizierung des GFP Transportes.....	89
5.4.4.1. In vitro Transport von GFP mit Cholchicin und Cytochlasin D.....	89
5.4.4.2 In vitro Transport von GFP mit Hemmung der ABC Transporter	90
5.4.5 Einfluss von CTB auf den VP60 Transport	90
5.5. Histologie / Immunohistochemie	91
5.5.1 Beschaffenheit des Darmes zumVersuchsende (Ussing-Kammer-Versuche).....	91
5.5.2. Detektion von GFP im Darmepithel	93
5.6 Tierversuch	93
5.6.1 Zootechnische Parameter der Tiere.....	93
5.6.1.1 Lebendmassezunahme der Tiere	93
5.6.1.2 Blutwerte der Tiere	94
5.6.2. NPTII Vorkommen	96
5.6.2.1. NPTII im Verdauungstrakt.....	96
5.6.4.2. Lösen von NPTII aus Magen chymus	96
5.6.2.3. Vorkommen von NPTII im Blut	97
6 Diskussion	99
6.1 Untersuchung der Verdauung in vitro.....	99
6.1.1 Voruntersuchungen	99
6.1.1.1 Entwicklung von Messmethoden	99
6.1.1.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten in vivo	100
6.1.1.3 Bestimmung eines geeigneten internen Markers.....	100
6.1.1.4 Ziele von in vitro Methoden.....	101
6.2.2 Aufschluss und Abbau von Futtermitteln in vitro	102
6.2.2.1 Abbau von Stärke	102

6.2.2.2 Aufschluss und Abbau von Proteinen	103
6.2.2.3 Aufschluss und Abbau durch Pankreatin und Gallenextrakt	105
6.2 In vivo Verdauung	108
6.3 Entwicklung einer in vitro Methode	110
6.3.1 Simulation der Mundhöhlenverdauung	110
6.3.2 Simulation der Magenverdauung	111
6.3.3 Simulation der Dünndarmverdauung	112
6.3.4 Vergleich des in vivo und in vitro Abbaus	113
6.4 Abbau von Proteinen	115
6.4.1 Abhängigkeit der Proteinfreisetzung und des Proteinabbau vom Pflanzenmaterial	117
6.4.2 Proteinabbau in Pflanzenmaterial	120
6.4.3 Unterschiede im Proteinabbau von Fremdprotein und Gesamtprotein	122
6.4.4 Proteinabbau (NPTII) im Tierversuch	124
6.5 Resorption	126
6.5.1 Resorption von GFP	128
6.5.2 Resorption der Modellproteine CTB, VP 60 und NPT II	130
7. Zusammenfassung	131
8. Literaturverzeichnis	134
9 Abbildungsverzeichnis	A
10 Tabellenverzeichnis	D
11 Anhang	E

A	Kartoffelsorte Albatros
ATP	Adenosintriphosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Bovine Serum Albumin
Bt	Bacillus thuringiensis
cry1Ab	Pesticidal crystal protein
Cositec	Colon simulation technique
CTB	Cholera Toxin Untereinheit B
D	Kartoffelsorte Desiree
DNA	Desoxyribunecleinsäure
EFSA	European Food Safety Authority
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay
EU	Europäische Union
FBN	Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere
GAD	Autoantigen Gentaminsäure Decarboxylase
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GVP	gentechnisch veränderte Pflanze
h	Stunde
HE	Hämatoxilin-Eosin
HCl	Salzsäure
His-Arg	Histidin-Arginin
HRP	HorseRaddish-Peroxidase
I	Stromstärke
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LUFA	Landesuntersuchungs und Forschungsanstalten
M	Molare Masse
mg	Milligramm
ml	Milliliter

mmol	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPT II	Neomycinphosphotransferase II
NfE	Stickstofffreie Extraktstoffe
NSG	Naturschutzgebiet
PF	Proteinfreisetzung
PBS	phosphated buffered saline
PCR	Polychainreaction
PHB	Polyhydroxybuttersäure
RHDV	Rabbit Haemorrhagic Disease Virus
S.E.	Standard Error
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SGF	simulated gastric fluid
t	Zeit
TBS	Tris Buffer Saline
TBST	Tris Buffer Saline + Tween
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNBS	TrinitroBenzenSulfonat
TS	Trockensubstanz
u.a.	unter anderem
USP	United States Pharmaceutical specification
uv	ultraviolett
V	Volumen
VK	Verdaulichkeiten
VP 60	Virskapsid 60
WT	Wildtyp
XA	Rohasche
XF	Rohfaser
XL	Rohfett
XP	Rohprotein

1 Einleitung

(Mandy Bruch)

Die heutigen Nutz- und Kulturpflanzen sind das Ergebnis einer Jahrhunderte andauernden Züchtung. Die Züchtung erfolgte mit der Zielstellung, gewünschte Eigenschaften, z. B. Resistenzen, Inhaltsstoffe, Wuchshöhe usw. zu erhalten, zu verbessern oder in einer Pflanze mehrere Eigenschaften zu vereinen. Dabei werden die Pflanzen mit den gewünschten Eigenschaften gekreuzt. Es kommt zur natürlichen Rekombination der Gene bei der sexuellen Vermehrung der Pflanzen, und die Nachkommen vereinen Eigenschaften der beiden Elternpflanzen. Allerdings können bei der konventionellen Züchtung nur Pflanzen miteinander gekreuzt werden, die einen bestimmten Verwandtschaftsgrad besitzen, da nur diese sich natürlich miteinander fortpflanzen können. Ein Transfer von Eigenschaften über Artgrenzen hinweg war mit konventionellen Methoden nicht machbar.

Durch die moderne Biotechnologie ist es möglich, Gene aus jedem Lebewesen in Pflanzen einzufügen, welche dann die entsprechenden Fremdproteine exprimieren. Damit konnten über Artgrenzen hinweg Pflanzen mit definierten Eigenschaften erschaffen werden (Keydel *et al.* 2005, Schüler *et al.* 2004). So wurden z.B. Pflanzen, die mit Hilfe von biotechnologischen Maßnahmen gegen Chemikalien oder natürliche Fraßfeinde resistent sind, erzeugt. Eines der bekanntesten Beispiele ist die Transformation von Mais mit dem Bt-Toxin (aus *Bacillus thuringiensis*), welche den Pflanzen eine Resistenz gegen Schädlinge (Maiszünsler, Maiswurzelbohrer) verleiht. Durch die Expression biogener Fraßgifte durch die Pflanzen selbst werden diese in die Lage versetzt, Schädlinge fast ohne Einsatz von chemischen Giften abzuwehren. Auch beim Anbau von Baumwolle, die das Bt-Toxin enthält (Bollgard-Baumwolle) konnte der Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln um 65-70% verringert werden (Monsanto). Eine weitere Möglichkeit der Gentechnik ist die Einbringung einer Herbizidresistenz, z.B. in *RoundupReady*-Sojabohnen (Resistenz gegen Herbizide mit dem Wirkstoff Glyphosat) und Mais NK603. Bei Herbizideinsatz sind diese Pflanzen gegenüber den Begleitkulturen im Vorteil und ein wesentlich niedrigerer Herbizideinsatz als bei konventionellen Sorten sollte genügen.

Weitere Anwendungen für die „grüne“ Gentechnik ist die gezielte Veränderung von Pflanzeninhaltsstoffen, um eine Verbesserung der menschlichen Ernährung oder der Fütterungsqualität zu erreichen. Dabei kann unter anderem die Lagerfähigkeit z.B. bei Tomaten (Flavr Savr Tomate) verbessert oder natürliche Inhaltsstoffe, wie z.B. die Fettsäurezusammensetzung für die menschliche Ernährung optimiert werden. Ziel ist im Allgemeinen eine bessere Versorgung der

Menschen mit wichtigen Nährstoffen. Im Jahr 2000 gelang es, Reis gentechnisch so zu verändern, dass in seinen Körnern Beta-Karotin (Vorstufe von Vitamin A) produziert wird. Der „Golden Rice“ wurde von Ingo Potrykus, ETH-Zürich, zusammen mit Peter Beyer, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, entwickelt. Dieser sollte dazu beitragen, die mangelhafte Vitamin-A Versorgung, die bei Kindern in den Entwicklungsländern oft zur Erblindung führt, zu verbessern. Ein weiteres Beispiel sind Sojabohnen, die mehr Methionin als die genetisch nicht veränderten Pflanzen enthalten. Diese Aminosäure musste bisher bei der Verwendung von Soja als Futtermittel zugesetzt werden.

Die Nutzung gentechnisch veränderter Pflanzen zur Herstellung von Impfstoffen (Sala *et al.* 2003) wurde ebenfalls schon beschrieben. Eine Vielzahl von transgenen Pflanzen ist in der Lage Antigene, z.B. gegen Hepatitis B, Tollwut oder Cholera zu produzieren (Walmsley & Arntzen, 2000). Die Vorteile liegen auf der Hand: günstige Herstellung von Impfstoffen, keine pathogenen Erreger und mögliche orale Verabreichung.

Für die Industrie sind gentechnisch modifizierte Pflanzen ebenfalls von Interesse. So könnten Pflanzen als Produktionssysteme eine wichtige Rolle übernehmen. Alle biogenen Stoffe lassen sich grundsätzlich in biologischen Systemen herstellen. Somit sind gentechnisch veränderte Pflanzen in der Lage, biogene Kunststoffe, Medikamente, und einfache organische Verbindungen (z.B. Aminosäuren, Vitamine) zu synthetisieren. Die Vorteile liegen in einfachen Produktionsverfahren, einer günstigen Ökobilanz, da alle Abfallprodukte, soweit sie anfallen, biologisch abbaubar sind und geringen Energiekosten (Produktion erfolgt hauptsächlich durch Sonnenenergie). Weiterhin kommt es bei chiralen Verbindungen nicht zur Bildung von Racematen, da in biologischen Systemen immer nur ein Enantiomer (z.B. von Aminosäuren) synthetisiert wird. Daher könnten biogene Kunststoffe eine Alternative zu Kunststoffen auf Erdölbasis werden, wenn die Erdölreserven abnehmen. Es gibt bereits Werkstoffe, die in transgenen Pflanzen produziert werden, z.B. ein Polyester (Polyhydroxybuttersäure, PHB) als biologisch abbaubarer Kunststoff (Bioplastik).

Aus diesen Gründen hat der Anbau gentechnisch veränderter Pflanzen in den letzten Jahren weltweit stetig zugenommen. 1996 betrug die Anbaufläche 7 Mio. ha. Binnen zehn Jahren stieg sie bis 2006 auf 102 Mio. ha an (Flachowsky, 2007). Vor allem in den USA und China werden Bt-Mais (seit 1997), Bt-Baumwolle (Zulassung 2002, Monsanto) und Bt-Soja angebaut. Das Marktvolumen des Weltmarktes für gentechnisch veränderte Pflanzen (GVP's) betrug 2003 zwischen 4,5 und 4,75 Mrd. US\$ (ISAAA). Auch in der europäischen Union werden GVP's angebaut. In Abbildung 1 sind der Anbau von Bt-Mais in ha und die Anzahl der gestellten Freisetzungsanträge in Deutschland dargestellt.

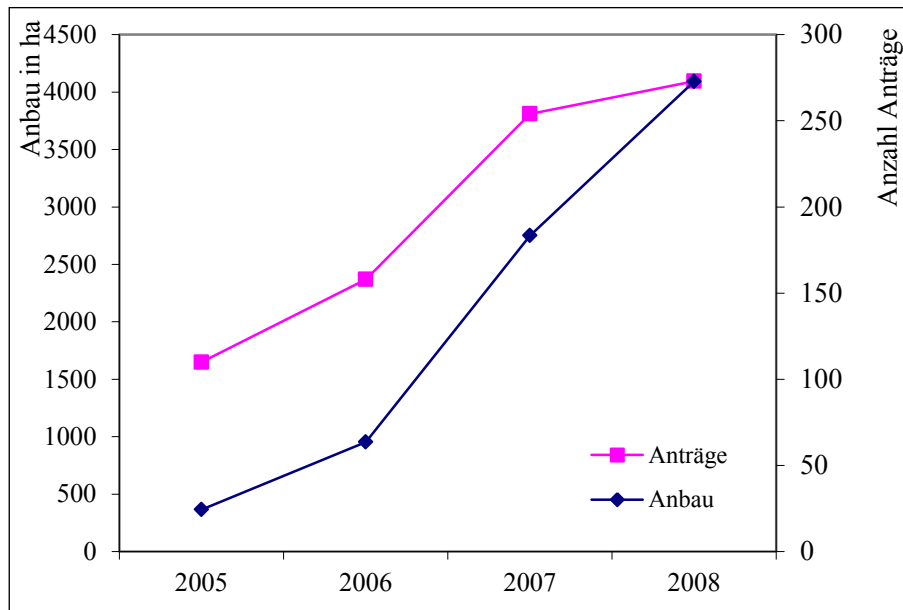


Abb. 1: Anbau von Bt-Mais in Deutschland (Quelle: Standortregister Deutschland)

Aber die Auswirkungen, die gentechnisch veränderte Pflanzen auf die Umwelt, den Boden und den Menschen haben, sind noch nicht ausreichend erforscht. Aufgrund der Aktualität der Technologie fehlen Langzeitstudien. Wenn gentechnisch veränderte Pflanzen angebaut und kommerziell als Nahrungs- oder Futtermittel verwendet werden sollen, ist eine umfassende Untersuchung über Gefahren und Risiken, die von diesen Pflanzen beim Anbau und nach Verzehr bzw. Fütterung ausgehen, notwendig.

Deshalb muss, bevor eine gentechnisch veränderte Pflanze zum Anbau zugelassen werden kann, die Unbedenklichkeit für Tier und Umwelt nachgewiesen werden. Es ist eine Risikobewertung in Rahmen einer Zulassung zum Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen nötig. Diese notwendige systematische Herangehensweise an die Prüfung neuer Produkte ist aber für gentechnisch veränderte Pflanzen noch nicht abschließend umgesetzt. Um einen Interessenkonflikt zu vermeiden, sollte die Risikobewertung nicht von den Herstellern der gentechnisch veränderten Pflanzen durchgeführt werden, sondern durch eine unabhängige Institution.

Zu diesem Zweck wurde in Rostock der innovative, regionale Wachstumskern „Entwicklung von Zulassungs- und Überwachungsverfahren für gentechnisch veränderte Nutzpflanzen“ entwickelt und vom BMBF gefördert. Darin haben sich regionale Unternehmen und verschiedene Institute der Universität Rostock zusammengeschlossen, um als Bündnis „BioOK“ die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Pflanzen als unabhängiger Dienstleister anzubieten.

Unter dem Dach von „BioOK“ sollen die Kompetenzen von Agrarbiotechnologie, der biologischen Sicherheitsforschung und der Technologien zur Analyse und Bewertung von Lebens-

Pflanzenschutz- und Arzneimitteln neue Methoden und Verfahren zur Bewertung von Auswirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen entwickeln.

In der hier vorliegenden Arbeit soll ein Verfahren entwickelt werden, das als Bestandteil von BioOk die in vitro Messung von ansonsten nur im Tierversuch zu erhebenden Daten über Verdauungs- und Resorptionsvorgänge im Darm gestattet. Die Vorabuntersuchung dieser Vorgänge ermöglicht die kostengünstige und tierschutzgemäße Abschätzung der Erfolgsaussichten bzw. des potentiellen Risikos einer oralen Applikation von, in transgenen Pflanzen erzeugten, Substanzen.

Denn die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten häufig Proteine, die bisher nicht Bestandteil der Nahrung waren. Ihre Wirkung auf den Verbraucher muss deshalb gründlich analysiert werden, bevor es zur Zulassung dieser Pflanzen kommt. Bisher wird dies im Wesentlichen über die Verfütterung des reinen Proteins oder in begründeten Fällen durch die Verfütterung der Trockensubstanz oder der intakten Pflanzen an Versuchstiere (EFSA-Richtlinien, 2004) getestet. Diese Untersuchungen sind zeit- und kostenintensiv und liefern nur beschränkte Erkenntnisse, da sie sich nur an der physiologischen Reaktion des Versuchstieres, nicht aber an dessen Verdauungs- und Resorptionsmechanismen ausrichten. Die Aufnahme der transgenkodierten Proteine oder anderer Substanzen, deren Zusammensetzung sich durch die Expression des Transgens geändert hat, ist aber Voraussetzung für eine Wirkung nach der Verfütterung. Das Ziel dieser Arbeit ist deshalb, die Entwicklung eines quantifizierbaren Verfahrens zur Detektion von Interaktionen der transgenkodierten Proteine mit dem Darmepithel und der Resorption aller durch die Expression des Transgens veränderten Stoffe und deren Auswirkungen auf den Organismus zu entwickeln.

2 Vorgehensweise dieser Methodenentwicklung

(Mandy Bruch)

Um ein quantifizierbares Verfahren zur Detektion von Wechselwirkungen der gentechnisch veränderten Proteine mit dem Darmepithel und der Resorption aller durch die Expression des Fremdgens veränderten Stoffe und deren Auswirkungen auf den Organismus zu entwickeln, bedarf es einer strukturierten Vorgehensweise. Es sollte ein Verfahren entwickelt werden, das die in vitro Messung von ansonsten nur im Tierversuch zu erhebenden Daten über Verdauungs- und Resorptionsvorgänge im Darm gestattet. Das Vorschalten einer solchen Untersuchung ermöglicht die kostengünstige und tierschutzgemäße Abschätzung der Erfolgsaussichten bzw. des potentiellen Risikos einer oralen Applikation von, in transgenen Pflanzen erzeugten, Substanzen. Zu Beginn stellte sich die Frage, welcher Organismus bzw. welche Art von Gastrointestinalsystem die Grundlage der zu entwickelnden in vitro Methode sein soll. Da die gentechnisch veränderten Pflanzen neben ihrem Einsatz als Futtermittel auch in der Humanernährung Verwendung finden sollen und der Einsatz von antigenproduzierenden Pflanzen in der Humanprophylaxe angestrebt wird, empfahl sich das Verdauungssystem von Menschen als Grundlage für die Modellentwicklung. Da aber aus ethischen Gründen Versuche nicht am Menschen durchgeführt werden können, bot es sich wegen der großen physiologischen Parallelen zwischen Schwein und Mensch (Gewicht, Verdauungssystem, Herz-Kreislauf-System) an, das Schwein als Versuchstier zu nutzen. Dazu war es notwendig die natürlichen Vorgänge im Gastrointestinaltrakt des Schweines zu analysieren, insbesondere die Zusammensetzung und Wirkung der in den Magen und Darmtrakt sezernierten Enzyme und Puffersubstanzen. Im folgenden Schritt galt es, schon beschriebene in vitro Modelle hinsichtlich ihrer Eignung zur Nachempfindung der Verdauungs- und Resorptionsvorgänge im Magen und Darm vom Schwein zu überprüfen. Nach einer umfangreichen Literaturrecherche konnte kein Modell gefunden werden, das sich speziell für diese Untersuchungen eignete. Daher wurde ein dem Schwein am nächsten stehendes Modell modifiziert und daraus eine neue in vitro Verdauungsmethode entwickelt. Anhand dieses entwickelten in vitro Modells war zu klären, was mit den transgenen Proteinen während des Verdauungsprozesses geschieht. Werden sie vollständig oder unvollständig abgebaut? Kommt es zur Resorption intakter Proteine oder Fragmente in den Organismus? Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurden gentechnisch veränderte Modellpflanzen der hier entwickelten in vitro Verdauung unterzogen. An diese Untersuchungen schloss sich die Simulation der Resorption der Proteine und / oder Proteinfragmente an. Es wurden erste Vorversuche mit der Ussing-Kammer-Technik am Institut für Veterinär-Physiologie der FU Berlin (Leitung

Prof. Martens) durchgeführt. Sie ergaben, dass Darmepithel von frisch geschlachteten Schweinen für die geplanten Resorptionsstudien geeignet ist. Anhand dieser Methode sollte geklärt werden, ob nicht abgebaute Proteine bzw. entstehende Fragmente am nativen Darmepithel resorbiert werden können. Im abschließenden Schritt wurde ein Fütterungsversuch durchgeführt, um die Ergebnisse der in vitro Verdauung mit den in vivo Daten zu vergleichen und die neue Methode zu validieren.

3 Theoretische Grundlagen und Literatur

3.1 Physiologie der Verdauung

3.1.1 Grundlagen der in vivo Verdauung

(Mandy Bruch)

Eines der Merkmale des Lebens neben Reproduktion, Differenzierung, Evolution und chemischer Signalgebung ist der Stoffwechsel. Darunter versteht man die Aufnahme, den Transport und die chemische Umwandlung von Nahrung im Organismus und die Abgabe von Stoffwechselprodukten in die Umwelt. Die mit der Nahrung aufgenommenen und für den Stoffwechsel relevanten Nährstoffe bestehen zum Großteil aus Makromolekülen (Polysaccharide, Proteine und Fette). Diese liegen nicht frei vor, sondern müssen aus der Nahrung herausgelöst und während des Verdauungsprozesses zu kleineren Molekülen abgebaut werden.

Unter der Verdauung versteht man die Zerkleinerung der Nährstoffe in ihre kleinsten Bestandteile. Die Zerkleinerung beginnt mit einem mechanischen Aufschluss während des Kauvorganges durch die Zähne im Mund/Maul. Es folgen ein chemischer (durch Chlorwasserstoffsäure) und ein enzymatischer Aufschluss, beginnend in der Maulhöhle, anschließend im Magen. Demschließen sich weitere enzymatische Abbauschritte im Dünndarm an. Nach der enzymatischen Aufspaltung können die Spaltprodukte vom Körper aufgenommen und im Stoffwechsel verarbeitet werden. Für eine gute Nährstoffversorgung ist eine optimale Futtermittelzusammensetzung und Verdauung von entscheidender Bedeutung. Die Nahrung von tierischen Organismen besteht aus drei Hauptbestandteilen: Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette. Diese können nur nach erfolgter enzymatischer Spaltung (Verdauung) vom Körper aufgenommen werden. Eine Übersicht der wichtigsten Verdauungsenzyme ist Tabelle 1 dargestellt. Niedermolekulare Bestandteile der Nahrung wie Wasser, Mineralstoffe und Vitamine müssen, um resorbiert werden zu können, nicht enzymatisch abgebaut werden.

Zur Verbesserung oder Neuentwicklung von Futtermitteln muss der Einfluss der Verdauung auf die Nährstofffreisetzung aus den Futtermitteln untersucht werden. Das kann in vivo (Tierversuch) oder in vitro (am Modell im Labor) erfolgen. Der Tierversuch ist die genaueste Möglichkeit, da die Untersuchungen unter exakt denselben Bedingungen erfolgen, die später bei der Anwendung vorliegen. Aber Tierversuche sind aufwändig, und die erzielten Ergebnisse durch die tierindividuellen Unterschiede sehr inhomogen. Zur Probeentnahme (aus dem Verdauungstrakt) ist darüber hinaus das Töten des Tieres notwendig, so dass nur eine bedingte Aussage über die einzelnen Einwirkungen des Verdauungssystems auf die zu verdauenden Nahrungsbestandteile gemacht werden kann.

Durch Anwendung von vereinfachten in vitro Modellen, können diese Untersuchungen im Labor erfolgen. In vitro Modelle haben unter ethischen und wirtschaftlichen Gesichtspunkten große Vorteile gegenüber Tierversuchen, stellen aber nur bedingt die natürliche Verdauung dar. Dafür liegen alle Abbauprodukte frei vor und können mit den unterschiedlichsten wissenschaftlichen Methoden nachgewiesen und untersucht werden.

3.1.1.1 Verdauung in der Maulhöhle

Die Verdauung der Nahrung beginnt schon während der Nahrungsaufnahme im Mund mit der mechanischen Zerkleinerung der Nahrung. Durch den Kauvorgang wird das Futter zerkleinert, angefeuchtet und die Strukturen werden aufgebrochen. Besonders bei Pflanzenfressern ist ein gründliches Kauen aufgrund der Grobstruktur des Futters erforderlich. Der von den Speicheldrüsen (*Glandulae parotis, submaxillaris und sublingualis*) sezernierte Speichel (Volumen beim Schwein und Mensch ca. 1-1,5 l /Tag (Breves, 2000)) hat mehrere Funktionen. Zu den verdauungsphysiologischen Aufgaben zählen vor allem der Schutz der Schleimhaut vor dem Austrocknen und die Durchfeuchtung der Nahrung. Der Speichel ist alkalisch und hat einen pH-Wert zwischen 7,2 und 8,4. Außerdem beginnt bei einigen Spezies in der Mundhöhle die enzymatische Kohlenhydratverdauung, denn die Speicheldrüsen einiger Säugetiere (Affen, Schweine, Elefanten) und des Menschen sezernieren das Enzym α -Amylase in den Speichel (Eigler, 1935). Die Speichelsekretion der großen Speicheldrüsen findet bei Schwein und Mensch nur während der Futteraufnahme statt und variiert mit der Futterbeschaffenheit.

An die Durchfeuchtung und Zerkleinerung der Nahrung schließt sich der Schluckvorgang an, bei dem der Futterbissen über den Rachen und die Speiseröhre in den Magen befördert wird.

3.1.1.2 Verdauung im Magen

Sowohl der Mensch als auch das Schwein gehören zu den Spezies mit einhöhligen Magen. Hinsichtlich der Schleimhautauskleidung lässt sich dieser unterteilen in einen einfachen Magen und in einen zusammengesetzten Magen. Der einfache Magen (Mensch, Hund, Katze) ist innen völlig mit Drüsen Schleimhaut ausgekleidet, die die Magenmukosa vor dem sauren Mageninhalt schützt und stellt eine sackartige Ausbuchtung des Verdauungstraktes dar (Salomon, 2008). Bei Tieren mit einem zusammengesetzten Magen (Schwein, Pferd, Rind) ist der Magen nur teilweise mit Drüsenepithel ausgekleidet, die übrigen Abschnitte sind mit einer drüsenlosen, kutanen Schleimhaut versehen.

Die Drüsenzzone lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: die Cardiadrüsenzzone, die Fundusdrüsenzzone und die Pylorusdrüsenzzone. Die Fundusdrüsen lassen sich in zwei Arten unterteilen, die Hauptzellen und die Belegzellen. Die wichtigsten Enzyme des Magen, Pepsinogen und

Prorennin (bei Kälbern und Lämmern) werden von den Hauptzellen sezerniert, während die Belegzellen Salzsäure sezernieren (Gesamtsekretionsvolumen beim Schwein ca. 2-3 l/ Tag, beim Mensch 1-2 l/Tag). Sowohl Pepsinogen als auch Prorennin werden durch die Salzsäure zum Pepsin bzw. Rennin aktiviert. Die Aktivierung erfolgt autokatalytisch durch Abspaltung eines Peptides, das aus ca. 45 Aminosäuren besteht (Young *et al.* 1996). Die Zellen der Cardia- und Pylorusdrüsen sezernieren Puffersubstanzen (HCO_3^-). Nachdem der Nahrungsbrei in den Magen transportiert wurde, beträgt die durchschnittliche Verweildauer beim Menschen eine bis fünf Stunden (Young *et al.* 1996). Diese kann beim Tier, in Abhängigkeit vom Futtermittel schwanken, z.B. bei Schweinen: Fleisch 4-8 h, Gemüse 10-24 h und Bohnen 24 h (Fermi, 1901). Durch die Salzsäure werden die mit dem Futter aufgenommenen Mikroorganismen abgetötet und nach dem Aufschluss durch die Magensäure findet im Magen auch der erste Schritt der Proteinverdauung statt.

Der niedrige pH-Wert im Magen denaturiert die Proteine, die danach durch Pepsin abgebaut werden können. Hedemann und Jensen (2004) haben die Aktivität des Pepsins im Magensaft von 28 Tage alten Ferkeln mit 17,3 U/ml bestimmt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach Berstad (1970). Beim Pepsin handelt es sich um eine Endopeptidase. Pepsin spaltet Proteine innerhalb einer Aminosäurekette, bevorzugt nach Phenylalanin oder Tyrosinresten. Durch die Spaltung nach Phenylalanin oder Tyrosin entstehen als Produkte des Pepsinabbaus keine einzelnen Aminosäuren, sondern Polypeptide unterschiedlicher Länge. Die proteolytische Aktivität von Rennin kann, außer beim Kalb, vernachlässigt werden (Kopper *et al.* 2004). Weiterhin wird im Magen monogastrischer Haustiere die gastrale Lipase gebildet, die eine hohe Resistenz gegenüber Pepsin zeigt. Diese kann Triacylglycerine zu Diacylglycerinen bzw. Monoacylglycerinen und Fettsäuren hydrolysieren (Scharrer, 2004). Ein zusätzliches Sekret ist der Intrinsic Faktor, ein Glykoprotein das für die intestinale Absorption von Vitamin B₁₂ erforderlich ist.

Im Allgemeinen dient der Magen als Speicher für den Nahrungsbrei und ermöglicht damit die Diskontinuität der Nahrungsaufnahme (Scharrer u. Wolfram, 2004). Um den Magen zu entleeren und die Absorptionsfähigkeit des Dünndarms nicht zu überfordern, wird die Entleerung des Magens außerdem über die Funktion einer Magenpumpe geregelt. Durch Kontraktionen und peristaltische Wellen erfolgt eine Durchmischung des Mageninhaltes und dieser wird dann in Richtung Duodenum transportiert.

3.1.1.3 Verdauung im Dünndarm

Aus dem Magen gelangt der zäh- bis dünnflüssige Chymus in den Dünndarm. Dieser ist in Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Hüftdarm) gegliedert. Seine Un-

terteilung ist bei allen Haustierarten gleich, Unterschiede lassen sich hingegen bei der Länge der einzelnen Darmabschnitte zwischen den Haustieren feststellen, so ist z.B. der Dünndarm beim Schwein insgesamt ca. 18 m lang, bei der Katze nur 1,32 m (Salomon, 2008). Die Verweildauer des Chymus beträgt dort ca. 7-9 h (Young *et al.* 1996). Dabei werden die aufgenommenen Nährstoffe durch die Einwirkung von Darmsaft, Pankreassaft und Galle weiter abgebaut. Bei der Sekretion im Duodenum wird Schleim und Bicarbonat sezerniert, um das Epithel vor dem sauren Mageninhalt zu schützen. Im Duodenum wird der Chymus weiterhin mit dem Sekret des Pankreas vermischt, das über einen Ausführungsgang in das Duodenum gelangt. Beim Mensch und beim Schwein werden pro Tag ca. 1-2 l Bauchspeichel sezerniert. Neben der Sekretion einer bicarbonatreichen Elektrolytlösung wird eine Vielzahl von Verdauungsenzymen freigesetzt (Tab.1). Das entscheidende Enzym für die Kohlenhydratverdauung im Dünndarm ist die α -Amylase. Der bei Mensch und Schwein in der Mundhöhle begonnene Abbau von Polysacchariden wird im Duodenum fortgesetzt. Polysaccharide sind Makromoleküle, die aus Zuckern aufgebaut sind. Die wichtigsten sind Zellulose und Stärke. Stärkemoleküle bestehen aus D-Glucose-Einheiten, die über glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Stärke besteht zu 10–30 % aus Amylose, linearen Ketten mit helikaler (Schrauben-) Struktur, die nur α -1,4-glykosidisch verknüpft sind und 70–90 % aus Amylopektin, stark verzweigten Strukturen, mit α -1,6-glykosidischen und α -1,4-glykosidischen Verknüpfungen. Zellulose dagegen ist ein unverzweigtes Polysaccharid, das aus mehreren Hundert bis zehntausend β -D-Glucose-Molekülen ((1→4) β -glykosidische Bindung) besteht. Zellulose kann von Säugetieren nicht direkt abgebaut werden, da diese nicht über eine β -Amylase verfügen, um die β -1,4 glyco-sidischen Bindungen zu spalten. Da Säugetiere nur Monosaccharide resorbieren (Scheu-nert und Trautmann, 1987) können, müssen die Polysaccharide zu Monosacchariden abgebaut werden. Bei der Spaltung von Stärke durch α -Amylase entstehen niederkettige Oligosaccharide. Diese werden durch die im Bürstensaum der Dünndarmepithelzellen lokalisierten Disaccharidasen zu den entsprechenden Einfachzuckern abgebaut und können über entsprechende Transporter resorbiert werden.

Weiterhin werden aus dem Pankreas Enzyme zu Proteinverdauung sezerniert. Die im Pankreassaft enthaltenen Proteasen werden als inaktive Vorstufe gebildet und nach ihrer Freisetzung ins Darmlumen durch Abspaltung einer spezifischen Peptidkette aktiviert. Die freigesetzten Peptidasen bauen die Polypeptide zu resorbierbaren Aminosäuren, Dipeptiden und Tripeptiden ab. Die Enzyme Trypsin und Chymotrypsin sind Endopeptidasen. Die bevorzugten Spaltstellen von Trypsin sind nach Arginin- und Lysinresten. Chymotrypsin spaltet die Peptidketten nach Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophanresten. Im Gegensatz dazu sind die Carboxypep-

tidasen A und B Exopeptidasen. Sie spalten Peptide nicht in der Kette, sondern vom c-terminalen Ende der Peptidkette her kleinere Peptide ab. Die Carboxypeptidase A spaltet hauptsächlich nach Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophanresten und die Carboxypeptidase B nach Arginin- und Lysinresten. Weitere Verdauungsenzyme zum Proteinverdau, die Aminopeptidasen, werden direkt von den Epithelzellen des Dünndarms bereitgestellt. Sie bauen Peptidketten vom N-Terminus her ab. Die letzte Stufe der Proteinverdauung stellen die Oligopeptidasen der Bürstensaummembran dar. Das sind integrale Membranproteine, die die Abspaltung von Aminosäuren, Di- und Tripeptiden katalysieren. Diese können dann über Aminosäure- oder den im Dünndarm lokalisierten Peptidtransporter PEPT1 (Ramamoorthy *et al.* 2000) aufgenommen werden

Auch die Enzyme für die Fettverdauung werden in der Bauchspeicheldrüse gebildet (Phospholipase und Pankreaslipase). Fette bestehen aus Glycerin, einem dreiwertigen Alkohol, an dessen Hydroxylgruppen über eine Esterbindung Fettsäuren gebunden sind. Lipasen spalten die Esterbindungen zwischen dem Glycerin und den Fettsäuren. Dabei entstehen neben den freien Fettsäuren und Glycerin (vollständiger Abbau) auch die entsprechenden Mono- und Diglyceride (partieller Abbau). Essentiell für die Fettverdauung ist die in der Leber gebildete Galle. Die wichtigsten Bestandteile der Galle sind die Gallensalze. Sie fungieren als Kofaktor (Tab. 1) für Lipase und Cholesterinesterase. Außerdem fördern sie die Fettemulgierung und formen aus den Produkten der Fettverdauung (Glycerin, freie Fettsäuren) Mizellen, die auch Cholesterin und die fettlöslichen Vitamine enthalten. Nur die Mizellen können den zur Absorption notwendigen Kontakt der lipophilen Bestandteile des Chymus (Fettsäuren, Cholesterin) mit den intestinalen Epithelzellen herstellen und resorbiert werden.

Die Nukleinsäuren werden durch Nucleasen und Phosphodiesterasen aus dem Pankreas und der intestinalen Mukosa zu Nukleotiden abgebaut und durch Nukleotidasen und Phosphatasen zu Nukleosiden dephosphoryliert. Nukleoside, im wesentlichen Inosin und Guanosin bzw. d-Inosin und d-Guanosin, können aus dem Darm resorbiert werden (Daunhauer, 2001).

3.1.1.4 Verdauung im Dickdarm

Nach dem Dünndarm gelangt der Chymus in den Dickdarm, welcher sich aus den Abschnitten Blinddarm (Caecum), Grimmdarm (Colon) und Mastdarm (Rectum) zusammensetzt (Salomon, 2008). Die Verweilzeit ist deutlich länger als in den anderen Abschnitten des Verdauungstraktes und die Ausbildung des Dickdarmes variiert in Abhängigkeit von der aufgenommenen Futterart. Beim Mensch beträgt das Feuchtgewicht des Dickdarminhaltes nur ca. 1% des Körpergewichtes, während es beim Schwein 5% sind. Besonders bei Pferd und Schwein finden in diesem Abschnitt umfangreiche fermentative Abbauvorgänge statt. Der Dickdarm ist,

Tab. 1: Verdauungsenzyme (Quelle: Kolb, Lehrbuch der Tierphysiologie)

Bildung	Enzym	Kofaktoren	pH-Optimum	Substrat	Spaltprodukte
Speicheldrüse	α -Amylase	Cl^-	6,5	Stärke	Maltose, Maltotriose, verzweigte Oligosaccharide
Magen	Pepsin		2-4	Proteine	Peptide
	Rennin	Ca^{2+}	5	Casein	Parakasein-Ca
Pankreas	Trypsin		8	Proteine und Polypeptide	Oligopeptide
	Chymotrypsin		8		
	Carboxypeptidase A,B		8		Aminosäuren und Peptide
	Kollagenase		5,5	Kollagen	lösliche Peptide
	Elastase		8	Elastin	wasserlösliche Peptide
	Lipase	Gallensäuren			Fettsäuren, Monoacylglyceride, Glycerin
	Cholesterinesterase	Gallensäuren		Cholesterinester	Fettsäuren, Cholesterin
	Phospholipase		7,5	Phospholipide	Fettsäuren, Lysophosphatide
	α -Amylase	Cl^-	8	Stärke	Maltose, Maltotriose, verzweigte Oligosaccharide
	(Desoxy)ribonuclease		7	DNA	Oligo(desoxy)nukleotide
Darmschleimhaut	Amino(di,tri)peptidasen		8	(Di,Tri)Peptide	Aminosäuren, Peptide, Dipeptide
	Maltase		7	Maltose	Glukose
	Saccharase		7	Saccharose	Glucose, Fructose
	Lactase		6	Lactose	Glyucose, Galaktose
	Isomaltase		7	Isomaltose	Glucose

abgesehen von den Vormägen der Wiederkäuer, der Hauptort der mikrobiellen Besiedlung. Die Bakteriendichte im Dickdarm ist sehr hoch (Schwein: 10^{11} - 10^{12} /ml Stuhl, Dünndarm: 10^6 /ml Chymus, Mensch: 10^{12} /ml (Autenrieth, 2003)). Im Dickdarm wird die noch nicht verdaute organische Substanz mikrobieller Fermentation ausgesetzt und ist beim Schwein der Darmabschnitt, in dem Zellulose abgebaut werden kann (Gedek, 1994). Die Darmbakterien bauen die Ballaststoffe (Zellulose, Hemizellulose, Lignin und Pektin) zu kurzkettigen Fettsäuren ab und dabei entstehen Methan, Wasserstoff, Ammoniak, Schwefelwasserstoff und Methansulfide (Young *et al.* 1996). Die wichtigste physiologische Funktion des Dickdarms besteht bei allen Tieren in der Absorption von Wasser, Elektrolyten, kurzkettigen Fettsäuren (Butter-, Propion- und Essigsäure) und anderen bakteriellen Metaboliten. Weiterhin sind die Darmbakterien in der Lage Vitamin K und Biotin zu bilden, die vom Darmepithel aufgenommen werden können.

3.1.2 Grundlagen der in vitro Verdauung

(Andre Kacholdt)

3.1.2.1 In vitro Verdauungsmodelle

„Ein Modell unternimmt den Versuch, die komplexe Wirklichkeit verständlich und anschaulich darzustellen, ist also eine Abstraktion und Beschreibung der realen Welt oder eines Teiles davon (...). Modelle können daher immer nur einen kleinen zielgerichteten und zweckgebundenen Ausschnitt der komplexen Realität repräsentieren. Die Funktion eines Modells besteht darin, aus den vorgegebenen Bedingungen Prognosen ableiten zu können.“ (Bill und Zehner, 2001)

Dabei finden bei in vivo Modellen (in vivo: lateinisch für im Lebenden) die Untersuchungen im lebenden Organismus statt (mobile nylon bag technique; Sauer *et al.* 1983). Im Gegensatz dazu simulieren in vitro Modelle (in vitro: lateinisch für im Glas) die wesentlichen biologischen Reaktionen außerhalb des Organismus. Dadurch fallen die durch die tierindividuellen Unterschiede verursachten Streuungen der Messwerte weg. Durch die Vereinfachungen (u.a. einfache anorganische Puffer) sind die Bedingungen nicht so komplex wie in der Wirklichkeit, was zu Abweichungen führen kann. Im Gegensatz dazu versuchen in silico Modelle durch die Simulation der biologischen Vorgänge am Computer Ergebnisse zu erhalten. Dabei werden bereits erfolgte Untersuchungen als Basis für ein computergestütztes Modell verwendet, welches dann Vorhersagen trifft. So können mit z.B. bekannten Bindungsdaten von Molekülen und deren chemischer Struktur Computermodelle der Bindungsstelle erstellt und auf-

grund der chemischen Struktur von Molekülen Vorhersagen zu deren Bindung an die Bindungsstelle gemacht werden.

Die Aufgabe der hier betrachteten *in vitro* Modelle ist es, die mechanischen, chemischen und enzymatischen Abbauprozesse aufgenommener Nahrung so nachzuahmen, dass detaillierte Aussagen über den Abbau von verschiedenen Inhaltsstoffen getroffen werden können.

Die meisten Enzyme des Verdauungstraktes eignen sich sehr gut für *in vitro* Simulationen, da sie, im Gegensatz zu anderen enzymatischen Reaktionen, keine oder nur einfache Kofaktoren benötigen (Tabelle 1). Während des natürlichen Verdauungsprozesses finden bei einigen Tieren (Schwein, Affe) im Maul bzw. beim Menschen im Mund (α -Amylase aus den Speicheldrüsen), im Magen (vorwiegend Pepsinogen aus den Magendrüsen) und im Dünndarm (Pankreasenzyme und Gallenflüssigkeit) eine Sekretionen von Verdauungsenzymen statt. Ein *in vitro* Modell, welches die natürliche Verdauung möglichst vollständig nachbildet, sollte die Auswirkungen dieser drei Sekretionen beinhalten. Diesem Ansatz folgt u.a. das Modell von Weng (Weng *et al.* 1992).

Abhängig von der zu untersuchenden Fragestellung sind allerdings Modifizierungen beschrieben. Viele *in vitro* Modelle dienen der Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Substanzen aus der aufgenommenen Nahrung (Aminosäuren, Ionen) und dem Abbau beziehungsweise der Stabilität von Proteinen gegen proteolytischen Abbau. Da α -Amylase nicht am Abbau der Proteine beteiligt ist, wird die Mundverdauung in diesen Methoden nicht simuliert (u.a. Miller *et al.* 1981, Sarria *et al.* 2001, Dupas *et al.* 2006 und Fässler *et al.* 2006). In diesen Methoden wird nur der chemische Aufschluss durch die Magensäure und die Verdauung von Proteinen durch die Proteasen aus Magen und Pankreas simuliert.

Für eine den natürlichen Bedingungen entsprechende Simulation müssen die Verdauungsschritte des Magens und des Pankreas berücksichtigt werden. Der Abbau durch nur jeweils eine Protease ist nicht vollständig, wie die Untersuchungen zur allergenen Wirkung von Haselnussproteinen zeigen. Dabei konnte nach Behandlung mit nur einem Enzym (Pepsin, Trypsin, Elastase) noch eine allergene Wirkung nachgewiesen werden, was mit einem unvollständigem Abbau erklärt werden kann (Wigotzki *et al.* 2000).

Erst der vollständige Verdau mit einer simulierten Magenverdauung (Pepsin) und anschließender Dünndarmverdauung mittels Schweinepankreasextrakt (Gemisch der Pankreasproteine) führt zu einem starken Verlust der Allergenität, was einem weitergehenden Abbau der Proteine entspricht (Vieths *et al.* 1999). Erste Hinweise darauf lieferten schon Mauron *et al.* (1955), die nachwiesen, dass ein vollständiger Abbau bis hin zu einzelnen Aminosäuren auch *in vitro* erst nach der Zugabe von Pankreatin stattfindet.

3.1.2.2 Enzymaktivitäten

Eine definierte Menge eines reinen Enzyms setzt unter gleichen Bedingungen (ϑ , t und Substrat) stets eine konstante Menge an Substrat um (Michaelis und Menten, 1913). Somit ist die Stoffmenge an Enzym, die nötig ist, um eine bestimmte Menge an Reaktionsprodukt zu erzeugen immer konstant. Das wird genutzt, um einheitliche Enzymmengen (Units) zu definieren. Units definieren die Menge eines Enzyms, welches unter definierten Bedingungen (meist Standardbedingungen) während einer Zeitspanne eine bestimmte Menge Reaktionsprodukt (z.B. 1 mmol) entstehen lässt. So kann eine Unit α -Amylase als die Menge des Enzyms definiert werden, die 1 mg Maltose bei pH=6,9 und 37°C in drei Minuten aus Stärke freisetzt (Bernfeld, 1955). Viele kommerzielle Enzyme sind Substanzgemische mit unterschiedlichsten Enzymgehalten. Dadurch kann nur durch die Angabe der Enzymaktivität in Units/mg Substanz eine verlässliche Angabe über die Enzymmenge gemacht werden, die in einer Menge gekauften Enzyms enthalten ist. Nur so können auch die in verschiedenen Arbeiten eingesetzten Enzymmengen miteinander verglichen werden.

Durch verschiedene Möglichkeiten der Bestimmungen der Aktivität gibt es unterschiedliche Arten von Aktivitäten bei einem Enzym. So ist die Somogy-Unit im Gegensatz zur Unit nach Bernfeld (1955) als die Menge an α -Amylase definiert, welche in 30 Minuten bei 40°C 1 mg Glucose aus Stärke freisetzt (Somogy, 1938). Auch bei den Aktivitäten von Proteasen gibt es verschiedene Möglichkeiten der Aktivitätsbestimmung, die sich vor allem in den verwendeten Substraten unterscheiden (z.B. Hämoglobin, His-Arg).

Die daraus resultierenden Aktivitäten sind oft schon wegen der nicht übereinstimmenden Temperatur nicht vergleichbar. Bei einigen in der Literatur beschriebenen Methoden werden die Enzymaktivitäten nicht angegeben (u.a. Tashiro and Ikegami, 1996). Daher ist in diesen Fällen ein Vergleich mit anderen Modellen nicht möglich. In vielen Arbeiten werden die eingesetzten Enzymmengen als Massen angegeben, so dass es nicht möglich ist, die verwendeten Enzymaktivitäten zu vergleichen.

3.1.2.3 Simulation des Kauvorganges

Zu Beginn des Abbaus erfolgt eine mechanische Zerkleinerung der Nahrung. Dadurch werden Zellwände aufgebrochen und die Inhaltsstoffe für Verdauungsenzyme zugänglich gemacht. Im Labor stehen viele verschiedene Aufschlussverfahren (Mahlen, Häckseln oder Musen) zur Verfügung, die den Kauvorgang simulieren können. Auch Homogenisieren ist eine Möglichkeit, Proben aufzuschließen (u.a. Mbanya *et al.* 2003 oder Pynaert *et al.* 2006). Diese Verfahren schließen biologisches Material jedoch in unterschiedlichem Grad auf. Ein Maß für den

erhaltenen Aufschlussgrad kann die Menge an freigesetzten Substanzen aus der aufzuschließenden Probe sein. So ist z.B. die Freisetzung von Arsen aus Seetang nach verschiedenen Behandlungen (Aufschlüssen) unterschiedlich hoch. Die freigesetzte Menge, im Vergleich mit dem Arsengehalt der unaufgeschlossenen Substanz, wird als Maß für den Aufschlussgrad verwendet. Es wurden die Freisetzungen durch Einweichen, Kochen, Backen und Toasten untersucht, und mit dem Gesamtarsengehalt des Feststoffes verglichen.

Dabei zeigte sich bei einer Seetangart eine deutliche Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Arsen durch das Kochen des Materials (Almela *et al.* 2005).

3.1.2.4 Simulation der Mundhöhlenverdauung

Nur in wenigen beschriebenen Methoden wird die Verdauung durch den Speichel simuliert. Die Aufgaben des Speichels *in vivo* sind u.a. der Beginn des Abbaus von Kohlenhydraten und die Pufferung des pH-Wertes im Mund (Breves, 2000).

Die Simulation *in vitro* erfolgt bei Engelhard und Breves durch in Phosphatpuffer, pH = 6,8, (PBS (**p**hosphate **b**uffered **s**aline)) gelöste α -Amylase unter Zugabe von NaCl, da Chloridionen als Cofaktor benötigt werden (Tabelle 1). Bei der dort verwendeten α -Amylase handelt es sich um das Enzym aus dem Pankreas. Es wird aber trotzdem in den hier erwähnten Untersuchungen zur Simulation der Speichelverdauung verwendet, da es sich in seinen physiologischen Eigenschaften nicht von der Speichelamylase unterscheidet (Weng *et al.* 1992).

Die in der Literatur beschriebenen Einwirkzeiten sind sehr verschieden und liegen zwischen 5 Minuten (Brandon *et al.* 2006) und 30 Minuten (Granado-Lorencio *et al.* 2007).

3.1.2.5 Simulation der Magenverdauung

Da die Magenverdauung *in vivo* hauptsächlich durch ein Enzym erfolgt, ist sie einfach zu simulieren (Kopper *et al.* 2004). Der pH-Wert im Magen wird in der Literatur in den verschiedenen Abschnitten mit 3,0 bis 3,7 beschrieben. Am Magenausgang liegt er bei 4,1 (Snoeck *et al.* 2004). Das pH-Optimum von Pepsin liegt bei pH = 1,7 bis 2,0 (Schlamowitz und Peterson, 1959). Die Magensäure besteht aus Salzsäure (HCl). Von den zwei Proteasen des Magens, Pepsin und Renin, beruht die gastrische Verdauung zum überwiegenden Teil auf der katalytischen Aktivität des Pepsins, weswegen für die Simulation der Magenverdauung die Inkubation mit Pepsin, gelöst in 0,01 M HCl (pH = 2,0) ausreichend ist (Kopper *et al.* 2004). Nach Zugabe des Pepsins wird ein pH-Wert von ca. 1,8 bis 2,0 eingestellt (u.a. Terada *et al.* 1975), was dem pH-Optimum von Pepsin, aber nicht den bereits erwähnten natürlichen Bedingungen entspricht. In anderen Arbeiten wird während der Inkubation mit Pepsin mit einem pH-Wert von 0,15 (Waisberg *et al.* 2004) gearbeitet. Auch die beschriebenen Einwirk-

zeiten von Pepsin sind sehr verschieden. Die Pepsininkubation erfolgt bis zu 24 h (Stunden) (Qiao *et al.* 2004) oder 48 h (Wiesemüller und Poppe, 1990). Gereinigtes Protein ist unter Pepsineinwirkung nach 30 Sekunden nicht mehr nachweisbar (Okunuki *et al.* 2002). Im Mittel liegen die Inkubationszeiten mit Pepsin bei zwei bis drei Stunden. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen in den verschiedenen Arbeiten sind ebenfalls sehr unterschiedlich (Tabelle 2).

Tab. 2: verschiedene Parameter der Simulation der Magenverdauung

Autor	pH-Wert	Aktivität	Temperatur	Zeit
		U / ml	°C	min
Savioe <i>et al.</i> 1989	1,90	197	37	30
Maskell und Smithard 1994	0,18	5000-7000	37	360
Spencer <i>et al.</i> 2000	0,66	1500	39	75
Waisberg <i>et al.</i> 2004	0,15	25000	39	180
Cone <i>et al.</i> 2005	1,00	10000	37	90

3.1.2.6 Simulation der Dünndarmverdauung

Die bisherigen Verdauungsschritte wurden jeweils durch den Einsatz eines Enzyms simuliert. Die Sekrete des Pankreas und der Galle enthalten jedoch eine Vielzahl an Enzymen (Tabelle 1). Während α -Amylase und Pepsin kommerziell verfügbar sind, trifft das für die einzelnen Enzyme des Pankreas nicht zu. Von diesen Enzymen sind nur Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidase A und B kommerziell verfügbar, allerdings von unterschiedlichen Tierarten. Es ist jedoch möglich, zur Simulation Enzyme verschiedener Tierarten zu verwenden (McDonough *et al.* 1990, Moreno *et al.* 2005). Die Alternative, die Enzyme selbst zu isolieren und zu reinigen, ist aus finanziellen und zeitlichen Gründen meist nicht durchführbar. Eine Simulation durch alleinige Verwendung dieser vier Enzyme ist allerdings unvollständig, da noch weitere Enzyme des Pankreassekrets fehlen. Auch die Gallenflüssigkeit enthält viele verschiedene Substanzen (u.a. Gallensäuren und Phospholipide), die eine wichtige Rolle bei der Verdauung und Resorption vor allem von Fetten spielen (Scharrer und Wolfram, 2000). Da die vollständige Palette der Enzyme des Pankreas und die einzelnen Inhaltsstoffe der Gallenflüssigkeit nicht einzeln erhältlich sind, wird in fast allen Modellen ein Gemisch aus Pankreatin und Gallenextrakt zur Simulation der intestinalen Verdauung verwendet (u.a. Rodriguez *et al.* 1999, Jovani *et al.* 2001, Sartia *et al.* 2001, Glahn *et al.* 2002). Bei Pankreatin han-

delt es sich um natürliche, lyophilisierte Pankreassuspension. Dadurch ist die Vielzahl von Enzymen, die die Bauchspeicheldrüse in den Chymus abgibt, auch im Pankreatin enthalten (u.a. α -Amylase, Trypsin, Lipase, Ribonuclease und Elastase). Da Pankreatin viele verschiedene Proteasen enthält, deren Substratspezifitäten sich zum Teil überlagern, ist es nicht möglich, die Aktivitäten der einzelnen Proteasen genau zu ermitteln. Pankreatin wird deshalb durch die proteolytische Gesamtaktivität, Elastaseaktivität und die Aktivität der α -Amylase charakterisiert. Die Spezifikation der Enzymaktivitäten erfolgt über Vielfache der United States Pharmacopeia specifications (USP) (1 x USP bis 8 x USP). Durch Zugabe von Gallenextrakt aus natürlicher Galle werden die für die Lipase und Cholesterinesterase nötigen Cofaktoren aus der Galle in der natürlichen Form bereitgestellt (Mauron *et al.* 1955). Durch die Verwendung von Pankreatin und Gallenextrakt erfolgt die Verdauungssimulation sehr nah am Tier. Beide Substanzen können als Produkte aus den jeweiligen Organen des Schweins bezogen werden.

Tab. 3: verschiedene Parameter der Simulation der Dünndarmverdauung

Autor	pH-Wert	Pankreatin	Galle	Temperatur	Zeit
		mg / ml	mg / ml	°C	h
McKay & Memmott 1991	7,5	1,5	1,5	37	10
Garrett <i>et al.</i> 1999	7,5	0,4	2,4	37	2
Liu <i>et al.</i> 2004	6,9	10,0	---	37	2
Ferruzzi <i>et al.</i> 2001	7,0	0,4	2,4	37	2

Die Bedingungen der Simulation unterschieden sich, wie schon bei der Magensimulation, in den verwendeten Konzentrationen (Tabelle 3). Einige Arbeiten verzichteten auf Gallenextrakt (Liu *et al.* 2004), andere bei der Untersuchung von Cholesterol auf Pankreatin (Tian *et al.* 2006). Dagegen sind die Einwirkzeiten mit überwiegend zwei Stunden und die Temperatur mit 37°C vielfach übereinstimmend.

3.1.2.7 Simulation der Dickdarmverdauung

(Mandy Bruch)

Um Aussagen zu fermentativen Stoffwechselvorgängen treffen zu können, ist eine Simulation der Dickdarmverdauung nötig. Zur Simulation der Verdauungsvorgänge im Dickdarm bei Pferden wird der „Caesitec“ (Caecum simulation technique) eingesetzt. In diesem System können verschiedene Substrate und Dosierungen mit definierter Pufferzufuhr inkubiert werden. Anhand der Parameter Gaszusammensetzung und -menge, pH-Wert, Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren und Ammoniak wird die fermentative Leistung der mikrobiellen Flora

eingeschätzt. Ein System für die *in vitro* Simulation der Verdauungsvorgänge im Colon bei Schweinen beruht auf einem ähnlichen Verfahren. Der „Cositec“ (Colon simulation technique) wird für Untersuchungen eingesetzt, bei denen die Auswirkungen von Antibiotika auf die Darmflora untersucht werden (Stuck *et al.* 1995 und Bender *et al.* 2001). Der Einfluss der im Dickdarm stattfindenden Vorgänge auf die Nährstoffzusammensetzung des Chymus ist gering, da die wesentlichen Verdauungs- und Resorptionsvorgänge von Nährstoffen abgeschlossen sind und hauptsächlich die Rückresorption von Wasser und Mineralstoffen erfolgt (Breves und Diener, 2000). Deshalb werden die Verdauungsvorgänge im Dickdarm in keiner publizierten Methode simuliert.

3.2 Physiologie der Resorption

(Andre Kacholdt)

3.2.1 Allgemeines

Nach der mechanisch-chemischen Aufspaltung erfolgt die Resorption (lat. *resorbere* = aufsaugen). Resorption ist die Aufnahme der Spaltprodukte aus dem Lumen des Verdauungstraktes in den Körper. Es wird in aktive und passive Resorption (Diffusion) unterschieden. Für passive Stoffaufnahmen ist ein Konzentrationsgradient nötig. Die Resorption erfolgt dabei von der hohen zur niedrigeren Konzentration. Die Diffusion hängt von der Struktur und Größe der Moleküle ab. Nur wenige Stoffe sind in der Lage, die Membran in größeren Mengen passiv zu durchdringen. Dazu gehören aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften freie Fettsäuren und Steroide (Testosteron). Die meisten anderen der im Darm vorliegenden Stoffe sind hydrophil, und können nur in sehr geringem Umfang die Membran passiv überwinden. Sie müssen aktiv, unter Verbrauch von Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat), durch entsprechende Transportproteine in den Körper aufgenommen werden.

3.2.2 Resorption *in vivo*

An der äußeren Zellschicht des Darmepithels (Bürstensaummembran) erfolgt die Resorption der durch die Verdauung entstandenen Spaltprodukte. Hier sind die Transportproteine und Kanäle lokalisiert, die für die Stoffaufnahme zuständig sind. Alle zu resorbierenden Moleküle müssen in Lösung vorliegen. Zucker können nur als Monosaccharide, Proteine überwiegend als freie Aminosäure oder als Di- und Tripeptide resorbiert werden. Freie Fettsäuren werden aufgrund ihrer lipophilen Struktur passiv aufgenommen. Mineralstoffe liegen im Wasser gelöst als Ionen vor und werden durch Kanäle oder Transporter aufgenommen. Bei Vitaminen muss in fettlösliche und wasserlösliche Vitamine unterschieden werden. Fettlösliche Vitamine

wie die Vitamine A, D, E und K werden passiv, wasserlösliche Vitamine z.B. B, C und Folsäure werden dagegen aktiv resorbiert.

3.2.3 Resorption von intakten Proteinen

Bei ausgewachsenen Säugetieren wurde die intestinale Mucosa als selektive Barriere gegen den Transport von Makromolekülen (Georgopoulou *et al.* 1988) und Proteinen beschrieben (Castell *et al.* 1997). Bei neugeborenen Säugetieren dagegen können die in der Muttermilch enthaltenen Immunglobuline aufgenommen werden (Clark jr., 1959, Jones und Waldmann, 1972, Abrahamson und Rodewald, 1982, jeweils IgG (Immunglobulin G) bei Ratten), und tragen wesentlich zur Immunabwehr des Neugeborenen bei. Dieser Transport wird vermittelt durch Bindung der Immunglobuline an einen Rezeptor, der an den absorptiven Zellen (m-cells in den Payerschen Platten; Heyman und Desjeux, 1992) des Dünndarms lokalisiert ist (rezeptorvermittelte Endocytose; Rodewald, 1973). Die noch nicht voll funktionierende Verdauung des Neugeborenen könnte die Ursache für den nicht erfolgten Abbau darstellen, da der Effekt nur einige Tage nach der Geburt nachweisbar ist.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Aufnahme von Bromealin, einer Cystein-Protease, aus der Nahrung in das Blut auch beim adulten Menschen *in vivo* nachgewiesen werden konnte (Castell *et al.* 1997). Am künstlich durchbluteten Jejunum (everted gut sac) von Ratten konnte die Aufnahme von Meerrettich-peroxidase (eng. horseradish peroxidase (HRP)), einem 40 kDa großen Protein, (0,25 % der applizierten Dosis nach 30 min) gezeigt werden (Yamaguchi *et al.* 1983). Diese *in vitro* Untersuchungen konnten an lebenden Ratten (*in vivo*) bestätigt werden (Warshaw *et al.* 1971). Hierbei konnten während der ersten 60 Minuten bis zu 1 µg HRP in der Lymphe (verabreichte Dosis: 28 mg/kg Körpergewicht) nachgewiesen werden. Es konnten Transporte von HRP an der Magenwand von Ratten, sowie an Dünn- und Dickdarm von Mäusen gezeigt werden (Heyman und Desjeux, 1992). Dabei wird am Caecum der Maus zwar deutlich mehr transportiert ($425 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) als am Jejunum ($4,1 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), aber der Anteil an intaktem Protein ist am Jejunum mit 30 % deutlich höher als am Caecum mit 2 %. Bei absoluter Betrachtung ist die Aufnahme von funktionellem Protein am Caecum mit $8,5 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ siebenmal höher als am Jejunum mit $1,2 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Das infektiöse Prionprotein (Huang *et al.* 2002) und das Interferon- γ (Terpent *et al.* 1998) sind weitere Beispiele dafür, dass Proteine als intakte Moleküle resorbiert werden können. Nicht nur hochmolekulare Proteine können intakt resorbiert werden, sondern auch die Aufnahme von größeren Partikeln, u.a. Stärkekörnchen und Asbestfasern in den Organismus konnte von Weiner (1998) nachgewiesen werden.

3.2.4 Stabilität von Proteinen gegen proteolytischen Abbau

Für die Resorption von intakten Proteinmolekülen ist eine zumindest partielle Stabilität gegen die gastrointestinalen Verdauungsenzyme nötig.

Gereinigtes Cry1Ab (Bt-Toxin) aus transgenen Mais ist bereits nach ca. 30 Sekunden vollständig abgebaut. Wird das Protein vor der in vitro Verdauung erhitzt, verkürzt sich die Abbaupzeit auf 20 Sekunden (Okunuki *et al.* 2002). Allerdings konnte im Tierversuch bei der Verfütterung von frischen Maisganzpflanzen an Rinder das Bt-Toxin im Pansen, Labmagen und Jejunum nachgewiesen werden (Einspanier *et al.* 2004).

Rekombinantes NPTII aus *Escherichia coli* wird in vitro durch Pepsin in weniger als zehn Sekunden vollständig abgebaut. Beim in vitro Abbau durch Pankreatin (ohne vorherige Pepsinbehandlung) entstanden sehr schnell Fragmente verschiedener Größen. Nach 15 Minuten war auch durch alleinige Pankreatinwirkung ein vollständiger Abbau von NPTII festzustellen (Fuchs *et al.* 1993).

Es ist zu sehen, dass Pepsin unter optimalen Bedingungen Proteine sehr schnell vollständig abbaut. Durch nicht optimale pH-Werte (pH = 3 bis 4) erfolgt der Abbau verlangsamt. Dabei zeigen sich zwischen den verschiedenen Proteinen Unterschiede im Abbau durch Pepsin. Beim Abbau von Albumin, Ferritin und Lactoferrin bei pH=4 wird Albumin vollständig, Ferritin partiell und Lactoferrin gar nicht abgebaut. Beim partiellen Abbau konnten verschieden große Fragmente durch WesternBlots nachgewiesen werden. Bei optimalem pH-Wert (pH = 2) kommt es zu einer vollständigen Verdauung aller drei Proteine, bei der die entstehenden Fragmente zu klein für eine Auftrennung in einem 5% igem Gel sind (Kalganekar und Lonerdal, 2008), was andere Autoren für andere Proteine bestätigen (Bejjani *et al.* 2007).

Somit scheint die Abbaubarkeit von Proteinen durch Pepsin proteinspezifisch verschieden zu sein. Moreno (2007) fasste die Stabilitäten von verschiedenen Proteinen gegen Pepsin zusammen. Einige Proteine sind nach wenigen Minuten nicht mehr nachweisbar (β -Conglycinin nach 2 Minuten und ns-LTP nach 0,5 Minuten; beide aus Soja). Andere Proteine können auch in zwei Stunden nicht vollständig durch Pepsin abgebaut werden (u.a. 2S Albumin aus Samsamen und ns-LTP aus Weintrauben).

3.2.5 Resorption von Proteinen und Proteinfragmenten aus GVPs

(Mandy Bruch)

Die Resorption von Fremdproteinen aus gentechnisch veränderten Pflanzen wurde bisher im Fütterungsversuch an verschiedenen Tierspezies untersucht. Dabei erhielten die Versuchstiere Futterrationen, die gentechnisch verändertes Pflanzenmaterial enthalten (Soja, Kartoffeln,

Mais). Zum Nachweis eines Übertrittes der Fremdproteine ins Blut und einer möglichen Anreicherung in Leber, Milz und anderen Organen wurden nach der Schlachtung der Versuchstiere Organ- und Blutproben entnommen und auf enthaltene Fremdproteine bzw. auf die DNA der Fremdproteine untersucht. In Kartoffeln exprimiertes CTB zeigt die Fähigkeit am GM1 Rezeptor zu binden (Arakawa, 1997). Mäuse, die mit CTB exprimierenden Kartoffeln gefüttert wurden, zeigten eine orale Immunisierung (Arakawa, 1997, Lauterslager *et al.* 2001), eine Detektion der Antikörper IgM, IgG, IgA war ebenfalls möglich. Nach oraler Gabe von Kartoffeln mit CTB an Menschen waren spezifische IgG Antikörper nachweisbar (Tacket, 1998). Das Viruskapsid 60 (VP60), exprimiert in Kartoffeln, bewirkte bei parenteraler Gabe eine spezifische Immunantwort gegen das infektiöse Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) (Castaon, 2002), bei mit isogenen Kartoffeln gefütterten Tieren konnten keine Antikörper gemessen werden. Auch Gil *et al.* (2006) konnten eine erfolgreiche Immunantwort, die durch orale Gabe von VP60 haltigen Pflanzen hervorgerufen wurde, feststellen, was durch die Arbeiten von Plana-Duran *et al.* 1996, Prietro *et al.* 2000 und Fernandez-Fernandez *et al.* 2001 bestätigt wird.

Ma *et al.* (1997) zeigten an Mäusen eine Inhibierung bei der Entwicklung von Diabetes nach oraler Gabe von Tabak, der das Diabetes Autoantigen Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) exprimiert.

Bei Fütterung von Schweinen mit Bt-Mais konnte die DNA des transgenen Maises bis zu 72h nach der letzten Fütterung in den Abschnitten des Darmtraktes nachgewiesen werden. Andere Untersuchungen zeigten, dass das Protein Cry1Ac an der Oberfläche des Mäusedünndarmes bindet und dort die physiologischen Gegebenheiten beeinflusst (Vazquez-Padron *et al.* 2000). Eine weitere Möglichkeit die Resorption bzw. den Transport von Modellproteinen nachzuweisen ist die Nutzung von isolierten Geweben oder Zellen. So wurde der Transport von Omega-3-Fettsäuren am isolierten Gewebe von menschlichem Kolon mittels der Ussing-Kammer untersucht (Helf, 2011). Anhand der Zellkultur kann außerdem die mögliche Bindung von Substraten (Proteinen, Aminosäuren, Arzneistoffen) an der Zelloberfläche getestet werden (Neumann *et al.* 2004).

Das Auslösen einer Immunantwort scheint den Transport der Antigene in den Körper zu bedingen, und deshalb als Nachweis für einen erfolgten Transport in Frage zu kommen. Allerdings wird auch die Ansicht vertreten, dass ein Kontakt mit den Immunzellen an der Epitheloberfläche im Darm oder an der Mundschleimhaut ausreichend ist. In diesem Falle ist keine Aufnahme der Antigene in die Zellen der Organismen nötig.

Die Resorption der verwendeten Modellproteine GFP (**G**rün **f**luoreszierendes **P**rotein), NPTII (**N**eomycin-**P**hospho**T**ransferase **I**I) und Cyanophycin ist bisher nicht im Fütterungsversuch gezeigt worden.

3.2.6 Beeinflussung des Proteintransportes durch verschiedene Inhibitoren

Proteine können aufgrund ihrer Größe nicht wie Ionen durch Kanäle oder wie viele andere niedermolekulare Stoffe durch Carrier transportiert werden. Eine Möglichkeit des Proteintransportes ist die Aufnahme durch rezeptorvermittelte Endozytose und anschließenden Transport der Vesikel mittels des Cytoskellets durch die Zelle. Das Cytoskellet besteht aus Mikrotubuli, einem Tubulinpolymer. Dessen Polymerisation kann durch Cholcin, das Gift der Herbstzeitlosen inhibiert werden. Durch das fehlende Cytoskellet wird der Vesikeltransport durch die Zelle, und somit der Proteintransport durch rezeptorvermittelte Endocytose unterbunden. In früheren Arbeiten (Kacholdt und Bruch unveröffentlicht) konnte eine Hemmung des Transportes von GFP am frisch isolierten Maudickdarm durch Cholchicin und Cytochalasin D, einen Inhibitor der Aktinfilamente, nachgewiesen werden.

3.2.7 Simulation der Resorption in vitro

(Andre Kacholdt)

3.2.7.1 Simulation durch Zentrifugation

Für die Simulation der Resorption kann argumentiert werden: alles was sich durch die Einwirkung der Verdauungsenzyme in der wässrigen Phase des „Chymus“ gelöst hat, ist potentiell resorbierbar. Deshalb wird in vielen in vitro Methoden im letzten Schritt der in vitro Ansatz zentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wird als „Chymus“ und das Pellet als „digested matrix“ bezeichnet (Brandon *et al.* 2006). Durch Zentrifugation mit 5000 g für 30 min bei 4°C wird die Resorption (Laparra *et al.* 2003, Bergqvist *et al.* 2006, Brandon *et al.* 2006) simuliert. Die in der flüssigen Phase gelösten Stoffe stellen den resorbierten Anteil dar (Almela *et al.* 2005). Die feste Phase ist der „unverdauliche“ Rest, von dem die resorbierten Stoffe entfernt worden sind: in vivo durch die Aufnahme in das Darmepithel, in vitro durch Entfernen des Überstandes nach erfolgter Zentrifugation.

3.2.7.2 Simulation durch Dialyse

Als zweite Möglichkeit kommt ein in vitro Verdau mit simulierter Resorption in Verdauungsbeuteln in Frage (Savoie *et al.* 1989, Shen *et al.* 1994, Hu *et al.* 2006), die Dialyseschläuchen ähneln. Diese befinden sich in einem größeren Pufferbehälter. Durch Poren definierter Größe können alle Verbindungen die kleiner als die Poren sind in den umgebenden Puffer diffundie-

ren. Die Porengröße ist dabei recht variabel. Es werden 15 kDa (Maekawa *et al.* 2006, Engle-Stone *et al.* 2005) aber auch 1 kDa (Peyron *et al.* 2006) verwendet. Somit wird angenommen, dass alles was durch die Verdauungsenzyme auf Größen kleiner als die Porengröße des Dialyseschlauches abgebaut bzw. abgespalten worden ist, auch resorbierbar ist. Diese Substanzen können noch während des *in vitro* Verdauungsvorganges dem Verdauungsansatz entzogen werde. Somit kommt diese Methode der natürlichen Resorption näher als die erst zum Abschluss der *in vitro* Verdauung durchgeführte Zentrifugation. Allerdings ist diese Methode aufgrund der beschränkten Größe von Dialyseschläuchen nicht geeignet, um größere Versuchsansätze durchzuführen, z.B. um das Restsubstrat genau zu analysieren. Ein weiterer Faktor ist die Zeitspanne, welche bis zur Einstellung eines Diffusionsgleichgewichtes vergeht und während der die Verdauungsenzyme weiterwirken. Nach der Dialyse ist eine Zentrifugation trotzdem erforderlich, da eine Abtrennung von Flüssigkeiten durch Dialyse nicht möglich ist. Der dabei übrig bleibende Feststoff, mit dem die weiteren Untersuchungen erfolgen, wird durch die Dialyse nicht beeinflusst, weswegen auf sie verzichtet werden kann.

3.2.7.3 Ussing-Kammer

(Mandy Bruch)

Eine Variante die natürliche Resorption zu simulieren, bietet der Einsatz einer Ussing-Kammer. Hiermit ist die Untersuchung der Resorption von Ionen, Monosachariden, Aminosäuren und Proteinfragmenten am nativen Darmepithel oder an Zellkulturen möglich (Neumann *et al.* 2004). Das Darmepithel regelt den Stofftransport vom Darmlumen ins Blut und ist gleichzeitig die Schutzbarriere nach außen. Es hat die Fähigkeit Reize aufzunehmen und damit Regulationsmechanismen auszulösen. Für in Wasser gelöste Stoffe/wässrige Lösungen gibt es zwei Transportwege über Darmepithelien: 1. den transzellulären Weg mit zwei Barrieren, der apikalen und der basolateralen Zellmembran und 2. den parazellulären Weg ('shunt path'), der ebenfalls über zwei transportphysiologische Barrieren, die 'Tight Junctions' und den Interzellularspalt führt (Powell, 1981). Der Stofftransport findet selektiv über das Epithel statt und ist die Grundlage für die Barrierefunktion des Epithels. Die epitheliale Barrierefunktion wird durch den transepithelialen Gesamtwiderstand (R_t) charakterisiert, der sich aus den Einzelwiderständen der Epithelbarrieren auf den beiden oben beschriebenen Transportwegen zusammensetzt (Lorenz, 2006). Durch die Barrierefunktion des Epithels werden ein elektrischer und verschiedene chemische Gradienten zwischen Darmlumen (mukosal) und Extrazellularraum (serosal) aufrecht erhalten, die durch transportphysiologische Vorgänge beeinflusst werden (Engelhardt und Breves, 2000). Die Reize aus dem Darmlumen

sowie aus dem Organismus bewirken als Reaktion des Epithels eine Veränderung der epithelialen Barriereigenschaften und/oder der Transportfunktionen.

Um die Barriereigenschaften des Dünndarmepithels zu beschreiben, ist die Messung des parazellulären Transportes mit Hilfe von [^3H]-Mannitol als Modellsubstanz bei zeitgleicher Dokumentation des transepithelialen Widerstandes R_t etabliert (Blinkslager *et al.* 1999b).

Es existiert eine enge Korrelation zwischen unidirektionalen [^3H]-Mannitol-Fluxen und Änderung des parazellulären Widerstandes (Madara *et al.* 1986, Madara und Dharmasathaphorn, 1985, Winckler, 1997). Hierbei wird der Begriff „Flux“ für den durch radioaktive Markierung direkt gemessenen transepithelialen Transport von Stoffen seit Ussing (1949) verwendet.

Mannitol (Mannit) als inerte, durch seine Molekülgrösse ausschließlich parazellulär transportierter Zucker repräsentiert die parazelluläre Permeabilität gegenüber ungeladenen Teilchen (Turner *et al.* 1997). Die R_t -Messung dagegen basiert auf den in durchlässigen Epithelien zum Grossteil parazellulär transportierten geladenen Teilchen (Bakker und Groot, 1984). Der R_t bietet demnach bei durchlässigen Epithelien eine gute Näherung für den parazellulären Widerstand und es kann per R_t der ionale Teil des parazellulären Transportes beurteilt werden (Bakker und Groot, 1984).

Erste Untersuchungen an der Ussing-Kammer zeigten den Transport von Natriumionen durch isolierte Froschhaut (Ussing und Zerahn 1951). Dabei wurde der Transport der elektrisch geladenen Natriumionen durch den verursachten elektrischen Strom nachgewiesen. Auch der Transport von anderen geladenen Molekülen (Aminosäuren, Peptiden) kann bestimmt werden (Neumann *et al.* 2004).

Es sind drei verschiedene Methoden zur Beeinflussung bzw. Erfassung der elektrophysiologischen Parameter, die beim Transport geladener Teilchen entstehen, etabliert: ‘Open Circuit’, ‘Short Circuit’ und ‘Voltage Clamp’ (Scheffler, 1984).

Open Circuit’: unter der Bedingung des ‘Open Circuit’, des ‘offenen Stromkreises’, wird die transmurale Potenzialdifferenz (PDt) direkt gemessen. Daneben wird durch Aussenden definierter Stromimpulse (XI) mit definierter Amplitude (50 bzw. 100 RA, bidirektionale Applikation der Strompulse) und Dauer (200 ms) eine kurzfristige Änderung (Abfall) der Potenzialdifferenz (PDt) bewirkt. Unter Zuhilfenahme des Ohm’schen Gesetzes kann mittels der PDt der transmurale Widerstand errechnet werden. Es wurde in der Versuchsanordnung unter ‘Open Circuit’-Bedingungen der Transport von Proteinen gemessen, um das Gewebe möglichst wenig zu belasten. Die Berechnungen des transmuralen Widerstandes sowie der transmuralen Potenzialdifferenz erfolgte automatisch durch die Clamp-Anlage (Scheffler, 1984). Alle 6 s

wurden Aufzeichnungen von PDt [mV] und Rt [$e \cdot cm^{-2}$] auf dem angeschlossenen Windows-PC vorgenommen.

‘Short Circuit’: Bei Anwendung des ‘Short Circuit’ (Kurzschluss) wird die transmurale Potenzialdifferenz durch Einspeisen eines externen Stromes auf 0 mV geregelt (= ‘geklemmt’). Durch den eingespeisten Strom, Kurzschlussstrom ($-I_{sc}$), werden die elektrogenen Ionenbewegungen kompensiert. Damit ist der $-I_{sc}$ äquivalent der Summe aller elektrogen transportierten Ionen und diesem Nettoladungstransport (I_{sc}) entgegengerichtet (Scheffler, 1984; Ussing und Zerahn, 1951). Durch diesen Kurzschluss des Epithels wird der elektrische Gradient ausgeschaltet, was zum ersten Mal von Ussing und Zerahn (1951) angewendet wurde. Werden dabei auf beiden Seiten identische Pufferlösungen verwandt, so ist auch der chemische Gradient ausgeschaltet. Tritt der Fall ein, dass auf beiden Seiten Pufferlösungen mit in einer Substanz verschiedener chemischer Zusammensetzung, doch mit gleicher Osmolarität verwendet werden, so ist zwar ein geringer chemischer Gradient vorhanden, jedoch der für passive Transportvorgänge sehr wichtige osmotische Gradient ausgeschaltet. Werden auf beiden Seiten gleiche Pufferfüllhöhe und gleiche Puffertemperatur benutzt, so sind auch der hydrostatische sowie der thermische Gradient ausgeschaltet. Diese Variante wurde für Vitalitätstest am Ende des Versuches genutzt. Dazu wurde der Phosphodiesterase-Inhibitor Theophyllin zugegeben, so dass sich eine Konzentration von 8 mM Theophyllin im Puffer befand und die Reaktion des I_{sc} auf die Zugabe aufgezeichnet.

Die Methode „voltage clamp“ wurde in diesen Untersuchungen nicht genutzt.

Bei Untersuchungen von nicht elektrogenen Transporten müssen in definierten Zeitabständen Proben aus dem serosalen Kompartiment entnommen werden, in denen der zu untersuchende Stoff mittels verschiedenster Nachweismethoden analysiert wird.

Das verwendete native Darmepithel wird Tieren direkt nach der Schlachtung entnommen und kann in einem Glukose-haltigen Puffer, der mit Carbogen (5% Sauerstoff in Kohlendioxid) begast wird, einige Stunden am Leben erhalten werden. In dieser Zeit können Resorptionsstudien durchgeführt werden.

3.2.7.4 In vitro Resorption von radioaktiv markierten Standards

(Mandy Bruch)

Die Bestimmung von Transportraten radioaktiv markierter Substanzen (z.B. $[^3H]$ -Mannitol) an biologischen Membranen hat unterschiedliche Gründe. Eine große Bedeutung hat die Verwendung von $[^3H]$ -Mannitol als Diffusionsmarker und zur Beurteilung von Gewebe- oder Zellkulturen hinsichtlich ihrer Barrierfunktion (Blinkslager et al., 1999b). Die Transportraten von $[^3H]$ -Mannitol dienen als Standard und werden international verwendet (Lorenz, 2006).

Der Transport in der Ussing-Kammer ist stark von der Intaktheit des Gewebes abhängig. Für Mannitol ist im Gewebe kein aktiver Transporter vorhanden. Der Transport erfolgt nur über Diffusion und kann daher als ein Maß für die Gewebeintaktheit verwendet werden. Die durch Diffusion übertretende Menge eines Stoffes pro Zeiteinheit hängt bei gleichen Membranen und Flächen nur von dessen Konzentration ab (erstes Ficksches Gesetz). Deshalb wird der zeitliche Transport t [$\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$] auf die Fläche A [cm^2] und die Donorkonzentration c [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] bezogen. Dadurch errechnet sich der Standardpermeabilitätskoeffizient P .

$$P = t \cdot A^{-1} \cdot c^{-1} \quad [P] = \text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{m}^3 = \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$$

Für die Bestimmung des Transportes wird radioaktiv (Tritium; ^3H) markiertes Mannitol verwendet. Dieses kann in geringsten Konzentrationen mittels Szintillationsmessung einfach nachgewiesen werden.

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte z.B. vier Tage nach Entwöhnung am Ferkel $12,05 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt werden (Spreeuwenberg *et al.* 2001; Verdonk *et al.* 2002). Dem US-Patent 6647358 sind die Werte (gemessen an Kaninchen, Tabelle 4) entnommen.

Tab. 4: Permeabilitätskoeffizienten für Mannitol an Kaninchengewebe in $10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$

Duodenum	Jejunum	Ileum	Colon
1,73	3,54	4,02	5,53

Die Permeabilitätskoeffizienten für Darmgewebe von adulten Schweinen wurden von den Autoren dieser Arbeit in unveröffentlichten Arbeiten mit $6,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt. Beim Vergleich der Werte mit denen von Spreeuwenberg (2001), Verdonk (2002) und des US-Patents kann eine Übereinstimmung festgestellt werden. Diese Werte können als Orientierung für spätere Untersuchungen dienen.

3.3 Analyse der Verdauungssimulation

(Andre Kacholdt)

3.3.1 Klassische Methoden

3.3.1.1 Weender Futtermittelmittelanalyse

Die Analyse der Veränderung der Zusammensetzung von Futtermitteln unter dem Einfluss natürlicher und simulierter Verdauung erfolgt, mit Ausnahme der Rohfettbestimmung, der Weender Futtermittelmittelanalyse. Henneberg und Stohmann entwickelten 1864 die heute noch geltenden Weender-Methoden (Methodenempfehlungen des VDLUFA (Naumann und Bass-

ler, Methodenbuchreihe 1983 bis 1997). Die Weender Futtermittelanalyse ist heute ein Standardverfahren zur Ermittlung der Inhaltsstoffe von Futtermitteln. Es wird nach Rohasche (CA oder XA), Rohfaser (CF oder XF), Rohprotein (CP oder XP), Rohfett (CL oder XL) und stickstofffreien Extraktstoffen (NfE) unterschieden; die Ergebnisse sind meistens auf die Trockenmasse (TS), seltener auf die Frischmasse bezogen.

Mit der Weender Analyse kann der Einfluss der natürlichen Verdauung des Tieres (durch Entnahme von Chymus) als auch der Einfluss der *in vitro* Verdauung auf zu untersuchende Futtermittel bestimmt werden. Somit ist auch ein Vergleich der *in vitro* Verdauung mit der Verdauung am Tier möglich. Auch die Einflüsse verschiedener *in vitro* Modelle auf die Futtermittel können miteinander verglichen werden.

3.3.1.2 Verdaulichkeiten (VK)

Zur Überprüfung von Modellen müssen Vorhersagen, welche die Modelle liefern mit der Realität verglichen werden. Der Grad der Übereinstimmung beschreibt die Qualität des Modells. Bei Modellen der Verdauung kann als Vergleichsmaßstab die Verdaulichkeit für verschiedene Inhaltsstoffe von Futtermitteln verwendet werden. Die Bestimmung erfolgt mit identischen Futtermitteln am Tier und am Modell. Verdaulichkeiten beziehen sich auf bestimmte Komponenten der Weender-Analysen im Futter (z.B. Rohprotein). Verdaulichkeiten geben an, wie viel der aufgenommenen Menge des jeweiligen Anteils der Organismus abbauen und resorbieren kann. Die prozentuale Differenz zwischen aufgenommener Substanz (wird im Futter bestimmt) und ausgeschiedener Substanz (wird im Kot oder Chymus bestimmt) ist die scheinbare Verdaulichkeit, da die endogenen Einflüsse (Sekretion im Darm) nicht berücksichtigt werden.

$$VK [\%] = (\text{aufgenommene Menge} - \text{Menge im Kot}) / \text{aufgenommene Menge} * 100$$

Bei der Bestimmung der Rohproteinverdauung ist die scheinbare Verdaulichkeit deshalb niedriger als die wirkliche, da endogener Stickstoff als Nahrungsstickstoff gewertet wird. Die Verdaulichkeit der organischen Substanz (y) kann anhand des Rohfaseranteils nährungsweise geschätzt werden (Axelsson, 1997). Für Schweine ist die Berechnung wie folgt:

$$y[\%] = 92,2 - 1,68 * RF[\%TS]$$

Die Grundlage für diese Schätzung beruht auf der Tatsache, dass die Zellinhaltsstoffe erst nach Aufschluss der Zellwände (Rohfaser) der Verdauung zugänglich sind (Kirchgessner,

1992). Die organische Substanz setzt sich aus Rohprotein, Rohfaser und Rohfett, und den stickstofffreien Extraktstoffen zusammen, und kann durch Subtraktion der anorganischen Anteile (Rohasche) von der Gesamtmasse bestimmt werden.

3.3.2 Molekularbiologische Nachweismethoden

3.3.2.1 Elektrophoresen

Zur Untersuchung des Einflusses der Verdauung auf die Proteine eignen sich Methoden, die die Größe der Proteine bestimmen, da sich bei der Verdauung die Größen der Proteine durch deren Abbau ändern sollten. Hierzu bietet sich die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, (SDS-PAGE) an, in welcher die Proteine ihrer Größe nach getrennt werden können. Eine Größenbestimmung ist durch die Verwendung von einem geeigneten Größenstandard möglich. In vielen Arbeiten konnte der Abbau von Proteinen durch Verdauungsenzyme (meistens Pepsin) gezeigt werden (Simonato *et al.* 2001, Almaas *et al.* 2006).

3.3.2.2 Immunologische Methoden

Proteine sind meist farblos. Nach einer Auftrennung durch SDS-PAGE ist eine Färbung der Proteine nötig. Unspezifische Verfahren (Commassie-Brilliantblau, Silberfärbung) färben alle Proteine an. Bei Extrakten aus Organismen entsteht ein Muster aus vielen Banden, da in einem Extrakt viele verschieden große Proteine enthalten sind. Möchte man ein spezielles Protein untersuchen, welches oft, im Vergleich zur Gesamtproteinmenge, relativ niedrig konzentriert ist, so ist die schwache Bande innerhalb der vielen anderen Banden nicht zu erkennen. Durch den Einsatz immunologischer Methoden können Proteine spezifisch detektiert werden. Dabei nutzt man die spezifische Bindung von Antikörpern. Die Proteine werden auf einer Oberfläche fixiert und durch spezifische Antikörper markiert, welche durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden. In Proben, die eine Vielzahl von Proteinen enthalten, wie zum Beispiel Chymusproben, sind immunologische Methoden eine sichere und schnelle Möglichkeit bestimmte Proteine nachzuweisen. Ein spezifischer, gegen die nachzuweisenden Proteine gerichteter Antikörper ist Voraussetzung.

Es gibt zwei verschiedene immunologische Methoden. Beim WesternBlot werden die Proteine aus dem Gel der Elektrophorese durch Strom auf eine Membran (meist Nitrozellulose) geblottet. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Somit kann beim Western-Blot die Größe eines Proteins durch den Einsatz geeigneter Marker bestimmt werden. Auf der Nitrozellulosemembran werden die Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Die Nachweisgrenze beim WesternBlot hängt von der Spezifität der Antikörper

per ab, ist aber wesentlich niedriger als bei einer Färbung mit Commassie. So wurde der Abbau von PrP^{sc} durch verschiedene Mikrobiota aus Rinderpansen und Dickdarm mit diesem Verfahren untersucht (Scherbel *et al.* 2007). Der Grad des Abbaus des Proteins wurde durch Gelelektrophorese und anschließende Immunodetektion nachgewiesen. Bei Untersuchungen des in vitro Abbaus von NPTII durch Pepsin und Pankreatin erfolgte der Nachweis mittels WesternBlot nach elektrophoretischer Auftrennung (Fuchs *et al.* 1993).

Beim ELISA (EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay) werden die Proteine an den Boden einer Mikrotiterplatte gebunden. Dadurch ist es möglich, die Intensität der Farbrektion zu vermessen und mittels einer Standardreihe die Konzentration des Proteins zu bestimmen. Aussagen über die Größe der Proteine sind hier nicht möglich. So konnte der Abbau von Alpha-1-Antitrypsin durch Pepsin quantifiziert werden (Chowanadisai *et al.* 2003). Auch ist beim ELISA die Sensitivität von der Qualität der Antikörper abhängig.

3.4 Charakterisierung der gentechnisch veränderten Pflanzen

(Mandy Bruch)

Gentechnische veränderte Pflanzen werden in der Zukunft eine wesentliche Rolle spielen. Allerdings sind die Auswirkungen, die die Genveränderung mit sich bringt noch nicht endgültig geklärt. Zur Herstellung einer transgenen Pflanze müssen mindesten zwei neue Gene eingebracht werden. Beim Ersten handelt es sich um die Information zur Herstellung des gewünschten Proteins. Das Zweite verleiht eine Resistenz gegen ein Antibiotikum und dient der Selektion der positiv veränderten Pflanzen. Durch rekombinante Proteine werden zwei Komponenten in der Pflanze verändert, einmal die DNA, und andererseits das Proteinmuster, welches um das neue Protein ergänzt wird. Gefährdungen könnten sowohl durch die Aufnahme und anschließende Expression von DNA, als auch durch das Protein und dessen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen auftreten.

3.4.1 Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen

Äußerlich sind transgene Pflanzen nur von Wildtyppflanzen zu unterscheiden, wenn das neue Gen zu äußerlichen Veränderungen an Farbe oder Form führt (Blütenfarbe, Großwuchs). Ist dies nicht der Fall, so müssen zum Nachweis der Veränderung die Proteine (ELISA, WesternBlot) oder die DNA ((Realtime)-PCR) molekularbiologisch nachgewiesen werden.

Sind weitere Unterschiede in den Inhaltsstoffen signifikant, muss das mit der Untersuchung der substantiellen Äquivalenz geklärt werden. Sie gibt an, ob die Unterschiede zwischen isogenen und transgenen Pflanzen größer sind als zwischen zwei isogenen Pflanzen.

Am besten ist die Substanzäquivalenz beim Bt-Mais untersucht, da er als einzige gentechnisch veränderte Nutzpflanze in der EU zugelassen ist, und deshalb großflächig angebaut wird (siehe Abbildung 1).

Es konnten keine Unterschiede im Amino- und Fettsäuremuster zwischen Wildtypmais und einer Bt-Maislinie (NX 6262-Bt 176) festgestellt werden. In der Futteraufnahme und Gewichtszunahme von Masthähnchen traten keine Differenzen auf (Tony *et al.*, 2003). Im Rahmen einer Fütterungsstudie mit Bt-Mais und isogenem Mais „Cesar“ konnten zwischen beiden Maissorten gewisse Unterschiede bei einzelnen Inhaltsstoffen (z. B. Rohprotein, Phosphor und Ölsäure) festgestellt werden, die jedoch nicht signifikant waren und im Normalbereich der Schwankungen von Körnermais lagen. Auch bezüglich der Verdaulichkeit und des Energiegehaltes konnten keine Unterschiede zwischen beiden Maissorten festgestellt werden (Flachowsky *et al.* 2000).

Bt-Mais und isogener Mais wurden auf Unterschiede in den erweiterten Weender Parametern, allen Aminosäuren und dem Fettsäuremuster untersucht. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Reuter *et al.* 2002). Diese Ergebnisse wurden in anderen Arbeiten (Chrenkova *et al.* 2002) bestätigt.

Beim Einsatz von Bt-Mais in der Lämmermast sind weder im Energiegehalt der Maissilagen noch bei den Parametern der Mast- und Schlachtleistung signifikante Unterschiede zwischen Bt-Mais und Wildtypmais aufgetreten. Es kam zu keinen Veränderungen der Magen- oder Darmschleimhaut der Lämmer. Es konnten keine Fragmente genetisch veränderter Mais-DNA aus tierischem Gewebe, Blut und Organen amplifiziert werden (Heckenberger, 2006).

Bei der Verfütterung von Bt-Mais an Masthähnchen (Bt-Mais > 60% in der Futterration) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Fettgehalt und den Tageszunahmen der Hähnchen. Die bei diesen Versuchen analysierten Maissorten 5506BTX (transgen) und G4665 (isogen) unterschieden sich nicht in der Zusammensetzung der Aminosäuren und den Weender Parametern (Brake und Vlachos, 1998). Änderungen in der Schlachtkörperzusammensetzung durch die Verfütterung von gentechnisch veränderten Mais im Futtermittel konnten bei Rindern, Schafen, Schweinen und Legehennen nicht festgestellt werden (Donkin *et al.* 2000). Es konnten keine Unterschiede in Energiegehalt, Weender Parametern, Mineralien und Aminosäuren gefunden werden. Diese Ergebnisse wurden in weiteren Arbeiten verifiziert (Flachowsky *et al.* 2007). Einzig ein Nachweis von FremdDNA aus dem BT-Mais im Muskelfleisch von Rindern wurde von Einspanier (2004) gezeigt. Der Gehalt an Methionin und oxidierten Schwefel erhöhte sich nach erfolgter Transformation eines Sonnenblumenalbumin-

gens in Lupinen signifikant (Molvig *et al.* 1997). In den anderen Aminosäuren waren keine Unterschiede zu finden.

Transgene Kartoffeln, die mit Inulin eine zusätzliche Zuckerkomponente produzieren, zeigten keine signifikanten Veränderungen im Ertragsniveau gegenüber der isogenen Ausgangslinie Désirée. Der Gehalt an Stärke war jedoch in dem Maße reduziert, wie der Gehalt an Inulin anstieg (ca. 2 %). Darüber hinaus hatten die transgenen Kartoffeln einen kürzeren Haupttrieb und bildeten keinen geschlossenen Bestand aus. In der Empfindlichkeit gegenüber Schadorganismen (z. B. Kraut- und Knollenfäule) kam es bei den Inulin-Kartoffeln zu keiner statistisch abgesicherten Veränderung (Hommel und Roppel, 2004).

In Zuckerrüben (Bartsch und Orf, 1996, Böhme *et al.* 2001) und Sojabohnen (Padgett *et al.* 1995, Taylor *et al.* 1999) konnten keine signifikanten Unterschieden zwischen den isogenen und transgenen Pflanzen nachgewiesen werden. Zwar können von gentechnisch veränderten Pflanzen auch über die Wurzeln rekombinante Proteine in den Boden abgegeben werden, die Anzahl bestimmter Mikroorganismen verändert sich dadurch aber im Vergleich zu isogenen Pflanzen nicht (Sabharwal *et al.* 2007).

3.4.3. Freisetzung von rekombinanten Proteinen aus genveränderten Pflanzen

(Mandy Bruch)

Damit Proteine aus Pflanzenteilen wie Blättern und Knollen freigesetzt werden können, ist es notwendig diese Pflanzenteile aufzuschließen. Dabei werden die Zellen zerstört und die Proteine können freigesetzt werden. Dabei werden rekombinante Proteine genauso freigesetzt, wie die natürlich in der Pflanze vorkommenden Proteine. Den größten Einfluss auf die Menge der freigesetzten Proteine sollte der Aufschlussgrad haben. Dieser kann auch über die Freisetzung von anderen Substanzen bestimmt werden. Rekombinante Proteine können aber auch aus der lebenden Pflanze freigesetzt werden. So beschreibt Sabharwal *et.al.* (2007) die Freisetzung verschiedener rekombinanter Proteine (u.a. GFP) aus Tabakpflanzen in den Boden. Nach 60 Tagen ist eine Konzentration von bis zu 75 µg/ml Bodenextrakt (β-Glucuronidase und Glycoprotein B) bzw. 200 µg/ml Bodenextrakt bei Human Serum Albumin festgestellt worden. Einflüsse auf die im Boden lebenden Mikroorganismen konnten aber nicht festgestellt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

(Mandy Bruch)

4.1.1 Pflanzenmaterial

Als Modellpflanzen kamen Knollen der Kartoffeln (*Solanum tuberosum* der Sorten Alba und Desiree) und Blattmaterial von Tabak (*Nicotiana tabacum* der Sorte Petit Havanna/Linie 14) zum Einsatz. Die gentechnisch veränderten Pflanzen exprimierten die folgenden Proteine:

GFP	Green Fluoreszenz Protein
CTB	Cholera Toxin Untereinheit B
VP 60	Virus Protein 60 kDa
NPT II	Neomycin PhosphoTransferase II
CY	CYanophycin

Tab. 5: Übersicht der zur Verfügung stehenden gentechnisch veränderten Pflanzen

Pflanze	Exprimiertes Protein	Linie	Kürzel
Tabak	GFP		T-GF
	Cyanophycin		T-CY
	VP 60		T-VP
	CTB		T-CX
	Fusionsprotein aus VP60 und CTB		T-VC
	Neomycinphosphotransferase II		T-N2
			T-WT
Kartoffel Alba	Cyanophycin	12	A-CY-12
		24	A-CY-24
	CTB	204	A-CX-204
		218	A-CX-218
	Neomycinphosphotransferase II		A-N2
			A-WT
Kartoffel Desiree	VP 60	6	D-VP-6
		17	D-VP-17
	Neomycinphosphotransferase II		D-N2
			D-WT

Diese Pflanzen wurden in der Professur Agrobiotechnologie (Leitung: Frau Professor I. Broer) des Institutes für Landnutzung der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock erzeugt, und für diese Arbeit im Rahmen des Wachstumskerns „Entwicklung von Zulassungs- und Überwachungsverfahren für gentechnisch veränderte Nutzpflanzen“ zur Verfügung gestellt. Die transgenen Pflanzen enthalten neben dem exprimierten Modellprotein (siehe Tab. 5) auch das Protein NPTII als Selektionsmarker.

4.1.2 Modellproteine

4.1.2.1 Viruskapsid 60 (VP60)

VP60 ist das Hüllprotein des RHDV (**R**abbit **H**aemorrhagic **D**isease **V**irus), des Erregers der hämorrhagischen Kaninchenseuche. Es hat ein Molekulargewicht von 60 kDa. Rekombinant in Pflanzen exprimiertes VP60 kann bei Verfütterung als Antigen bei einer Immunisierung von Kaninchen gegen RHDV dienen (Martin-Alonso *et al.* 2003).

In die Auswahl geeigneter pflanzlicher Expressionssysteme für die Impfstoffproduktion wurden neben Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), die zum Verzehr geeignet sind, auch Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) aufgenommen. Sie gehören zwar zu den oral nicht applizierbaren Rohstoffpflanzen, werden aber auf Grund ihrer Transformationseffizienz und ihrer guten Vermehrungsfähigkeit in viele Untersuchungen mit einbezogen (Mikschofsky, 2006).

4.1.2.2 Cholertoxin Untereinheit B (CTB)

Beim CTB handelt es sich um die Untereinheit B des Cholera-toxins. Das Molekulargewicht von CTB beträgt ca. 10 kDa. Die pentameren CTB Untereinheiten haben eine Molekülgröße von 50 kDa (Arakawa *et al.* 1997). Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Ausnutzung von immunantwortverstärkenden Substanzen wie ADP ribosylierende Enterotoxine (z.B. CTB; Frytag und Clement 2005) die immunogene Wirkung von pflanzlich erzeugten Antigenen, z.B. VP60 erhöht werden kann. Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass durch bloßes Vermischen von Zielantigen und CTB-Komplex keine immunantwortsteigernde Reaktion erfolgt (Yu und Langridge, 2001, Blanchard *et al.* 1998). Dagegen haben beide festgestellt, dass durch Fusion des CTB-Komplexes mit dem Zielantigen, die Antikörperproduktion nach oraler Immunisierung in den Zielorganismen erhöht war.

4.1.2.3 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

GFP besteht aus 238 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 26,9 kDa. In der Struktur sind überwiegend β -Faltblätter ausgebildet. Die Fluoreszenz basiert nicht auf einem Umbau durch ein externes Enzym oder nachträglich integrierte Substanzen. Sie kommt vollständig ohne

eventuell zellspezifische Prozessierungssysteme aus. In seinem Ursprungsorganismus erhält GFP seine Anregungsenergie durch strahlungsfreien Energietransfer vom Photoprotein Aequorin. In Anwendungen wird GFP immer optisch angeregt. Das unmodifizierte, natürlich vorkommende GFP hat zwei Anregungsmaxima. Das erste liegt bei einer Wellenlänge von 395 nm, das zweite bei 475 nm. Die Emissionswellenlänge liegt bei 509 nm (Veith, 2005).

4.1.2.4 Cyanophycin (CY)

Cyanophycin ist ein aus Aspartat und Arginin bestehendes Polypeptid, welches von Cyanobakterien synthetisiert wird. Es kommt in den Bakterien in form unlöslicher Einschlüsse im Cytoplasma vor und dient als Speichersubstanz für Kohlenstoff, Stickstoff und Energie. Seine Biosynthese erfolgt unabhängig von Ribosomen. Dabei werden in einer ATP-abhängigen Reaktion Asparaginsäure und Arginin an einen Cyanophycin-Primer angelagert (Steinbüschel, 2006).

4.1.2.5 Neomycinphosphotransferase II (NPT II)

Das Gen für die Neomycinphosphotransferase II (NPTII) vermittelt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin und wird in den Modellpflanzen als Marker-Gen für die Transformationen eingesetzt. Jede der Pflanzen, außer der Wildtypvariante, ist somit Träger des NPTII Gens. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 30 kDa (de Vries und Wackernagel, 1998)

4.1.3 Futtermischungen

(Mandy Bruch

4.1.3.1 Jungsauenaufzuchtfutter

Das im Fütterungsversuch verwendete, pelletierte Jungsauenaufzuchtfutter hatte die folgende Zusammensetzung: Energiegehalt in MJ/kg:13,4; Rohproteingehalt (%): 17,5; Lysin (%):1,11; Methionin / Cystin (g): 4,1, Threonin (g): 4,9, Tryptophan (g): 1,4 Calcium (%) 0,80; Phosphor (%) 0,60; Natrium (g) 1,0 (Firma: FUGEMA Malchin). Das pelletierte Futter wurde als Alleinfuttermittel in zwei Rationen pro Tag verfüttert.

4.1.3.2 Mischung mit genetisch veränderten Pflanzen

Für die Mischung mit gentechnisch veränderten Pflanzen wurde das Jungsauenaufzuchtfutter (siehe Kapitel 4.1.3.1) mit gentechnisch veränderten Kartoffeln der Sorte Albatros, die einmal das Fremdprotein NPT II und einmal des Fremdprotein Cyanophycin, exprimierten, vermischt.

4.2 Methoden

(Andre Kacholdt)

4.2.1 Charakterisierung von Pflanzenmaterial

4.2.1.1 Bestimmung der Flüssigkeitsaufnahme lyophilisierter Pflanzen

Bei der Freisetzung von rekombinanten Proteinen aus Pflanzenmaterial in eine Flüssigkeit (meist Puffer) entsteht eine Lösung des Proteins. Je mehr Protein aus der Pflanze freigesetzt wird, desto höher ist die Konzentration an Protein, die sich in der flüssigen Phase einstellt. Durch die Bestimmung der Konzentration kann das Lösungsvermögen von verschiedenen Pflanzenmaterialien bestimmt werden. Dabei ist zu beachten, dass bei der Resuspendierung von lyophilisiertem Material, ein Teil der Flüssigkeit in das trockene Material aufgenommen wird und somit nicht mehr bei der Berechnung der Konzentration berücksichtigt werden darf. Da die Konzentration das Volumen im Nenner aufweist, käme es bei der Berechnung der Konzentration mit dem Volumen des zugegebenen Puffers zu einer Verfälschung. Deshalb muss bei der Berechnung der Konzentration die Menge der Flüssigkeit um die vom getrockneten Pflanzenmaterial aufgenommene Menge korrigiert werden.

Pflanzenmaterial wird in ein Zentrifugenröhrchen ($V = 50 \text{ ml}$) eingewogen und PBS wird zugegeben. Die Einwaage (E) und Flüssigkeitsmenge werden notiert. Nach 30 Minuten wird in einer Heraeus Multifuge 3L-R (Festwinkelrotor Nr: #3334) 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Die PBS-Aufnahme wird wie folgt berechnet:

$$WA [\text{ml/g}] = (\text{Zugabe PBS} [\text{ml}] - \text{dekantiertes PBS} [\text{ml}]) / E [\text{g}]$$

4.2.1.2 Freisetzung von Protein aus Pflanzen

Pflanzenmaterial wird in ein Becherglas eingewogen und PBS zugegeben. Nach 30 Minuten wird bei 14000 rpm in einer Hettich Tischzentrifuge eine Probe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert und aus dem Überstand mittels ELISA die Konzentration c bestimmt. Die Proteinfreisetzung (PF) unter Berücksichtigung der PBS-Aufnahme der Pflanze kann wie folgt berechnet werden:

$$PF [\text{mg/g}] = c [\text{mg/ml}] * (\text{Zugabe PBS} [\text{ml}] - (E [\text{g}] * WA [\text{ml/g}])) / E [\text{g}]$$

4.2.1.3 Abbau von Proteinen aus Pflanzen

Der Einfluss der Lagerungsdauer auf den Gehalt an Proteinen (Gesamtprotein oder Modellprotein) wurde über einen Zeitraum von 6 Monaten nach der Ernte mittels ELISA bestimmt. Diese Arbeiten wurden von der Arbeitsgruppe Agrobiotechnologie (Leitung Frau Professor I. Broer) durchgeführt.

4.2.2 Aufschlussmethoden

4.2.2.1 Lyophilisieren

Die Lyophilisierung von Pflanzenmaterial, Chymusproben und Proben der in vitro Verdauung erfolgte in der Lyophille (Firma: Edwards, Freeze Dryer Modulyo) bei ca. -15 bis -20 °C und einem angelegten Vakuum (< 6 mbar).

4.2.2.2 Häckseln

Frische Materialien wurden in einem Küchenmixer der Firma Vorwerk auf Stufe 9 für 18 sec gehäckselt. Es ergaben sich Partikelgrößen von 1 mm - 5 mm bei Tabak und 2 mm - 3 mm bei Kartoffeln.

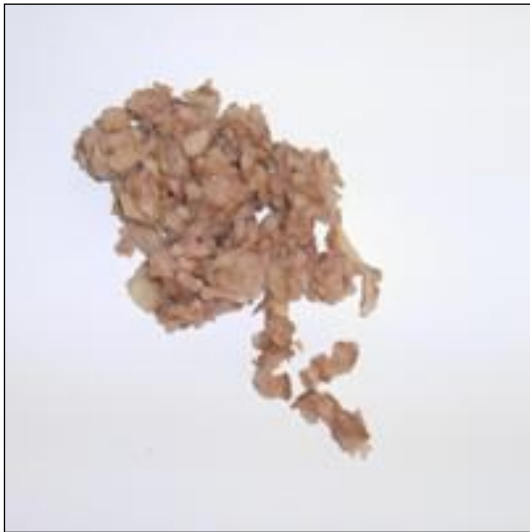


Abb. 2: gehäckselte, frische Kartoffelknollen



Abb. 3: gehäckselte, frische Tabakblätter

4.2.2.3 Mahlen

Zum Mahlen der Proben auf 1 mm und 0,2 mm Korngröße wurde eine Mühle der Firma RENTSCH ZM 1 verwendet. Bei feineren Mahlgraden kam eine Kugelmühle, hergestellt von RENTSCH, Modell MM200 zum Einsatz.

4.2.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten im Gastrointestinaltrakt des Schweins

4.2.3.1 Bestimmung der Speichelaktivität

Die Speichelaktivität wurde im nativen Speichel von Schweinen und Menschen bestimmt. Zur Bestimmung der Speichelaktivität ist unter Verwendung von SALIVETTEN® (SARSTEDT) den Probanden Speichel entnommen worden. Dabei wird der Speichel von Zellstofftampons aufgenommen. Ausreichend Speichel war nach 0,5 bis 2 Minuten abgegeben worden. Durch Zentrifugation bei 4300 rpm (Heraeus Labofuge 200) ließ sich der Speichel aus den Salivetten gewinnen.

Die Aktivität der α -Amylase im Speichel wurde nach Bernfeld (1970) bestimmt. Dabei wird die Aktivität über die Menge des entstehenden Reaktionsprodukts (Maltose) beim Abbau von Stärke bestimmt. Die Quantifizierung der Maltose erfolgte über eine Farbreaktion mit 3,5 - Dinitrosalicylsäure. Das Protokoll wurde von SIGMA-ALDRICH (Enzymatic Assay of α -Amylase) übernommen.

4.2.3.2 Bestimmung der Pepsinaktivität

Zur Bestimmung der Pepsinaktivität im Magen von Schweinen wurde 10 frisch geschlachteten Tieren (kommerzielle Schlachtung von Schweinen im Schlachthaus des FBN in Dummerstorf) Mageninhalt entnommen und zentrifugiert. Im Zentrifugat wurde die Pepsinaktivität nach Anson *et al.* (1938) mit leichten Modifizierungen nach Berstad (1970) bestimmt. Das Protokoll wurde von SIGMA-ALDRICH (Enzymatic Assay of Pepsin) übernommen.

4.2.4 Weender-Analyse

Die Bestimmung der Roh Nährstoffe im Rahmen der Weender-Analyse erfolgten nach den Methodenempfehlungen des VDLUFA (Naumann und Bassler, Methodenbuchreihe 1983 bis 1997) mit lyophilisiertem und auf 1 mm Korngröße gemahlenen Probenmaterial. Alle Werte sind in % TS angegeben.

4.2.4.1 Trockensubstanz (TS)

Das Leergewicht des Schmelztiiegels wird ermittelt und 2 g der Substanz werden eingewogen. Anschließend wird dieser für 3 h bei 105 °C in einem „HERAEUS FunctionLine T20“ getrocknet. Das Abkühlen nach dem Trocken erfolgt im Exikator. Nach der Rückwaage kann die Trockensubstanz berechnet werden.

$$TS [\%] = (\text{Rückwaage} - \text{Leergewicht}) * 100 / \text{Einwaage}$$

4.2.4.2 Rohasche (RA)

Die Tiegel mit der getrockneten Substanz werden im Muffelofen gestellt und deren Inhalt wird bei 600°C in 8 h verascht. Das Abkühlen nach dem Veraschen erfolgt im Exikator. Nach der Rückwaage kann die Rohasche berechnet werden.

$$\text{RA [\%TS]} = (\text{Rückwaage} - \text{Leergewicht}) / \text{Einwaage} * \text{TS [\%]}$$

4.2.4.3 SalzsäureUnlöslicheRohAsche (SURA)

Zur Bestimmung der Verdaulichkeit kann die in 4 M HCl unlösliche Asche als Marker verwendet werden. Mit Hilfe eines Wägeschiffchens werden 5 g der Substanz in ein 250 ml Becherglas eingewogen. Nach Zugabe von 50 ml 4 M HCl wird die Probe 30 min in der Salzsäure gekocht. Nach 30 min wird das Kochen durch Zugabe von kaltem Wasser beendet, und die entstandene Suspension durch einen aschefreien Faltenfilter (Munktell Grad 392) filtriert. Das Becherglas wird mehrmals nachgespült. Anschließend wird der Rückstand im Filter bis zur Chloridfreiheit des Filtrats gewaschen (Chloridnachweis mit Silbernitrat). Anschließend wird der Filter in einem Tiegel getrocknet und danach bei 600 °C 8 h verascht. Das Abkühlen nach dem Veraschen erfolgt im Exikator. Nach der Rückwaage kann die SURA berechnet werden.

$$\text{SURA [\%TS]} = (\text{Rückwaage} - \text{Leergewicht}) / \text{Einwaage} * \text{TS [\%]}$$

4.2.4.5 Rohprotein (RP)- bestimmung nach Kjeldahl

Zur Bestimmung des Rohproteins werden mit Hilfe eines Wägeschiffchens 1,0 g einer festen Probe oder unter Verwendung einer Pipette 5 ml einer flüssigen Probe in ein Kjeldahlauflschlussgefäß überführt. Dazu werden eine Kjeldahltablette (VWR) und 25 ml konz. Schwefelsäure gegeben. Der Aufschluss erfolgt bei 360°C in einem „GERHARD Kjeldatherm“ bis sich alle Feststoffe gelöst haben und die Lösung eine hellgrüne Farbe angenommen hat. Dadurch wird der gesamte Stickstoff in Ammoniumsalze überführt. Diese werden durch Zugabe Natronlauge als Ammoniak freigesetzt, der mittels Wasserdampfdestillation an einem „GERHARD Vapodest“ in 2 % Borsäure (unter Zusatz von Mischindikator 5 zur Ammoniakdestillation; VWR) geleitet wird.

Destillationsprogramm:	NaOH	8 sek.
	Reaktion:	240 sek.
	Absaugen:	26 sek.

Der entstehende Borsäure-Ammoniak-Komplex wird mit 0,05 M (0,1 N) Schwefelsäure zurücktitriert. Beim Farbumschlag von grün nach violett ist die Titration beendet.

$$\text{Stickstoff [mg]} = V_{\text{titriert}} [\text{ml}] * 1,4007$$

4.2.4.6 Bestimmung der Rohfaser (RF)

Als Rohfaser wird der in verdünnten Säuren und Laugen nicht lösliche Teil einer Substanz bezeichnet. Die Bestimmung der Rohfaser erfolgte in zwei Teilen: einer Heißextraktion am „FOSS FIBERTEC 2010 Hot Extractor“ und einer Kaltextraktion mit Aceton am „FOSS FIBERTEC 1021 Cold Extractor“. Bei der Heißextraktion wurden 0,5 g der Probensubstanz in einen FOSS Glasfiltertiegel (Pore 2) eingewogen und mit einem Spatel wurde zusätzlich Celite (Merck) dazugegeben. Anschließend wurde der Filtertiegel in den FOSS EXTRAKTOR eingesetzt und der Inhalt für 30 Minuten mit 0,13 M Schwefelsäure gekocht. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O erfolgte ein weiterer Kochvorgang mit 0,23 M Kaliumhydroxidlösung. Die Heißextraktion war nach weiterem dreimaligem Waschen beendet. Zur Kaltextraktion wurde der abgekühlte Tiegel aus dem FOSS EXTRAKTOR entfernt und drei Mal mit Aceton gewaschen. Nach der Kaltextraktion wurden die Tiegel bei 105 °C getrocknet und gewogen. Anschließend werden sie bei 500°C verascht. Die Rohfaser ist die Differenz zwischen den beiden Rückwaagen.

$$\text{RF [\% TS]} = \text{Rückwaage}_{105^{\circ}\text{C}} - \text{Rückwaage}_{500^{\circ}} / \text{Einwaage} * \text{TS [\%]}$$

4.2.4.7 Bestimmung des Rohfettes (RX)

Als Rohfett wird die in Petrolether lösliche Fraktion bezeichnet. Zur Rohfettbestimmung nach Weender werden mit Hilfe eines Wägeschiffchens 3,0g einer festen Probe in ein Kjeldahlauflösungsgefäß überführt und 30 min mit 4 M HCl in einer „FOSS SOXTEC 1047 Hydrolyzing Unit“ aufgeschlossen, durch Glasfiltertiegel (G3) filtriert, gewaschen und dann bei 105 °C getrocknet. Die getrockneten Filtertiegel werden anschließend an einer „FOSS SOXTEC AVANTI 2050 Auto Extraction Unit“ in ein bei 105°C vorgetrocknetes Gefäß mit Petrolether abgesenkt, so dass aus dem Filtrat in den Fritten das Rohfett herausgelöst wird. Nach Entfernen des Petrolethers durch Destillation (das Rohfett bleibt zurück) werden die Gefäße bei 105 °C getrocknet. Das Abkühlen nach dem Trocken erfolgt im Exikator. Nach der Rückwaage kann das Rohfett berechnet werden.

$$\text{RX [\%TS]} = (\text{Rückwaage} - \text{Leergewicht}) / \text{Einwaage} * \text{TS [\%]}$$

Modifikation nach Kacholdt:

Beim Aufschluss mit 4 M HCl könnte eine Hydrolyse der Fette zu freien Fettsäuren und Glycerin erfolgen. Damit ist es nicht mehr möglich im Rohfett den enzymatischen Abbau nachzuweisen. Die Extraktion erfolgt aus diesem Grund kalt. Das Probematerial wird an einer Kugelmühle (RENTSCH MM 200) sehr fein gemahlen. Anschließend werden 5 g der feingemahlten Probe in einen Erlenmeyerkolben eingewogen. Nach Zugabe von 50 ml Petrolether erfolgt eine Kaltextraktion des Rohfettes über 48 h. Der Reaktionsansatz wird anschließend durch Faltenfilter (Munktell Grade 392) in Kolben gefiltert. Die Masse der Kolben ist vorher bestimmt worden. Der Petrolether wird aus dem Filtrat durch Destillation entfernt. Das Rohfett bleibt im Kolben zurück und kann quantifiziert werden.

4.2.4.8 Verdaulichkeiten

Bei der Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeiten wird durch die Bestimmung eines Markers (4 M HCl unlösliche Asche) die resorbierte Menge des ursprünglichen Futters bestimmt. Aus dem Verhältnis des Markers im Futter zum Marker im Chymus kann die resorbierte Menge des Futters berechnet werden, da der Marker bei der Verdauung nicht verändert wird. Somit kommt es mit zunehmender Resorption zu einer Anreicherung des Markers im Chymus.

4.2.5 Methoden zur Analyse der in vitro Verdauung**4.2.5.1 Gravimetrische Bestimmungen der abgebauten Masse**

Die Charakterisierung der Wirkung von Verdauungsenzymen auf Schweinefuttermittel wurde an Jungsauenaufzuchtfutter (FUGEMA Malchin) durchgeführt. Dazu wurden G4 Glasfiltertiegel bei 105°C getrocknet und gewogen. Dann wurden 2 g Futtermittel in die Tiegel gegeben und unten mit einem Stopfen dicht verschlossen. Verschiedene Enzymlösungen wurden zugegeben. Am Ende des Versuchs wurde der Stopfen entfernt, und die Flüssigkeit abgesaugt. Danach wurden die Tiegel bei 105°C getrocknet und anschließend zurückgewogen. Die auftretende Massedifferenz wird durch die Wirkung der Flüssigkeit verursacht. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit dem jeweiligen Enzympuffer, aber ohne Enzymzugabe. Die Enzymlösungen wurden vorher ebenfalls durch einen G4 Filtertiegel gefiltert. Die Differenzen zwischen den Kontrollansätzen und den Ansätzen mit Enzym sind allein in der Wirkung des Enzyms begründet. Mit dieser Methode wurde der Einfluss von Einwirkzeiten und eingesetzter Enzymkonzentration untersucht.

4.2.5.2 FACE-PA-Gele (*Fluorophore-Assisted-Carbohydrate-Electrophoresis on PA Gels*)

Zur genaueren Untersuchung des Abbaus von Stärke durch α -Amylase wurden die durch die Spaltung entstehenden reduzierenden Oligosaccharide in einem 40 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht (Jackson, 1990).

Zum Auftragen der Proben mit der optimalen Menge an Zucker ist eine Gesamtzuckerbestimmung nötig (Dobois *et al.* 1951):

200 μ l Probe + 200 μ l Phenol (5% in H₂O) + 1 ml H₂SO₄ → vermessen bei 490 nm in einem Spekrophotometer

Mit Hilfe einer Standardbezugsreihe wird der Gesamtzuckergehalt ermittelt. Zur Derivatisierung werden 10 bis 25 μ l/ml Zuckergemisch oder 0,1 bis 0,5 μ g/ml eines Zuckers in einer Speed- Vac getrocknet. Das Pellet wird mit 10 μ l ANTS (8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid 0,2 M in Aceton : Wasser 3:17) und 10 μ l NaCNBH₃ (1 M in DMSO) aufgenommen. Nach erneuter Trocknung in 40 μ l Gelladepuffer (0,5 M TRIS pH = 6,8 in 50 % Glycerin in H₂O) aufnehmen und 20 μ l auf das Gel auftragen. Für 40% ige Gele sind keine fertigen Lösungen erhältlich. Aus diesem Grund müssen die Lösungen direkt aus festem Acrylamid und Bisacrylamid hergestellt werden.

Lösungen für den Gelansatz:

Acrylamidlösung (50 % 18:1)	47,37 g Acrylamid		
	2,63 g Bisacrylamid	mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen	
Laufpuffer:	125 mM TRIS		
	960 mM Glycin	pH = 8,3	
LowerTRIS:	0,5 M TRIS	UpperTRIS:	1,5 M TRIS
	pH = 6,8		pH = 8,8
Trenngel (40 %):	8,00 ml Acrylaamid	Sammelgel:	1,00 ml Acrylamid
	1,25 ml LowerTris		2,50 ml UpperTRIS
	0,75 ml H ₂ O		6,50 ml H ₂ O
	10 μ l 10 % APS		50 μ l 10 % APS
	3 μ l TEMED		15 μ l TEMED

4.2.5.3 Dünnschichtchromatographie

Der Nachweis der entstehenden freien Fettsäuren, bei gleichzeitiger Abnahme der Triglyceride, erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Diese wurde in Zusammenarbeit mit dem Veterinärphysiologisch-Chemischen Institut der Universität Leipzig unter Anleitung von Frau Dobeleit durchgeführt.

Das quantitativ erfasste Rohfett aus der modifizierten Rohfettextraktion wurde in den Kolben von der Destillation in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (1:1) so gelöst, dass sich eine Konzentration von 2 mg Rohfett /ml Lösungsmittelgemisch ergab. In den gleichen Konzentrationen wurden als Markersubstanzen Ölsäure, Stearinsäure, Palmitinsäure, Linolensäure, Linolensäure und ein Triglyceridstandard gelöst. Von diesen Lösungen wurden je 2 µl oder 5 µl auf eine HPTLC Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen (Merck Kieselgel 60 F₂₅₄). Die Platte wurde vorher in einem Leerlauf mit einem Chloroform/Methanol Gemisch gewaschen. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 95:5. Nach erfolgtem Lauf wurde die Platte zur Aktivierung mit einem Fön getrocknet, bis kein Lösungsmittelgeruch mehr wahrzunehmen war. Nach Besprühen mit Molybdophosphorsäure wurde die Platte bei 180 bis 200 °C entwickelt. Fettsäuren werden durch Molybdophosphorsäure blau angefärbt.

4.2.5.4 Bestimmung von Triglyceriden

Die Bestimmung von Triglyceriden erfolgte enzymatisch mit Hilfe eines Kits der Firma Greiner Diagnostik GmbH (Katalog Nr. 183000). Elastase spaltete die vorhandenen Triglyceride in freie Fettsäuren und Glycerin. Das Glycerin wurde anschließend durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen. 20 µl der Proben aus der Dünnschichtchromatographie (2 mg/ml) wurden in ein Glasröhrchen pipettiert. Das Lösungsmittel ist durch Inkubation bei 37° in einem Wärmeschränk entfernt worden. Mit den so getrockneten Proben konnte der Essay nach beiliegender Anleitung angewendet werden.

4.2.5.5 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Zur denaturierenden Proteingelelektrophorese werden die Proben mit Gelladepuffer bei 95°C verkocht. Anschließend erfolgt eine Elektrophorese mit 150 V im Polyacrylamidgel (PAA-Gel). Das PAA-Gel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel.

Trenngel 12,5 %):	- 7,0 ml H ₂ O - 4,0 ml 4 x LowerTris (0,5 M TRIS pH = 8,8) - 5,0 ml rotiphorese® Gel 40 von Carl Roth GmbH
Sammelgel:	- 3,25 ml H ₂ O - 1,25 ml 4 x UpperTris - 0,50 ml rotiphorese® Gel 40 von Carl Roth GmbH
Elektrophoresepuffer:	- 25 mM Tris - 192 mM Glycin - 0,1 % (w/v) SDS - pH = 8,8

Die Gelapparatur wird zusammengesetzt. Zur Polymerisation werden jeweils 80 µl 10% (w/v) APS und jeweils 10 µl TEMED zugegeben. Danach erfolgt das Gießen des Trenngels. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wird das Sammelgel gegossen. Der Gelkamm wird eingesteckt. Nach fertiger Polymerisation können die Proben aufgetragen werden.

4.2.5.6 ELISA (*Enzyme linked immunoabsorbent Assay*)

Der ELISA zum Nachweis von NPT II wurde von der Firma BIOFORDS in Frankreich bezogen. Alle weiteren verwendeten ELISAs sind Entwicklungen der Firma BIOSERV Analytik und Medizinprodukte GmbH Rostock (incl. Antikörper). Alle ELISAs sind als Sandwich-ELISA aufgebaut. Die Mikrotiterplatten werden über Nacht mit Kaninchenantikörpern beschichtet, die dann das Antigen binden. Für den Nachweis werden biotinierte Antikörper verwendet, die dann mit einem Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (HRP) Konjugat detektiert werden.

Zu Beginn jedes ELISA wird die Mikrotiterplatte dreimal mit 200 µl PBS gewaschen.

ELISA zum Nachweis von GFP

- 1 h blocken mit 200 µl 1% Milchpulver in PBS
- 3 x waschen mit 200 µl PBS
- 50 µl Antigen auftragen und 60 min bei 37 °C inkubieren
- 3 x waschen mit 200 µl PBS
- 50 µl rabbit-Anti-GFP 1:250 in KVP auftragen und 30 min bei 37 °C inkubieren

3 x waschen mit 200 µl PBS
50 µl HRP - Konjugat auftragen und 30 min bei 37 °C inkubieren
3 x waschen mit 200 µl PBS
100 µl TMB (SERAMUN) auftragen und 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
mit 100 µl 0,25 M H₂SO₄ abstoppen und bei 450 nm vermessen (Microtiter® Plate Reader; Model Dias Reader; Firma: Dynex Technologies (The Microtiter® Company))

ELISA zum Nachweis von VP60

50 µl Antigen auftragen und 60 min bei 37 °C inkubieren
3 x waschen mit 200 µl PBS
50 µl rabbit-Anit-VP60 1:4000 in CaBi auftragen und 30 min bei 37 °C inkubieren
3 x waschen mit 200 µl PBS
50 µl HRP - Konjugat auftragen und 30 min bei 37 °C inkubieren
3 x waschen mit PBS
100 µl TMB (SERAMUN) auftragen und 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
mit 100 µl 0,25 M H₂SO₄ abstoppen und bei 450 nm vermessen

ELISA zum Nachweis von CTB

50 µl Antigen auftragen und 60 min bei 37 °C inkubieren
3 x waschen mit 200 µl PBS
50 µl rabbit-Anit-CTB 1:5000 in CaBi auftragen und 30 min bei 37 °C inkubieren
3 x waschen mit 200 µl PBS
50 µl HRP - Konjugat auftragen und 30 min bei 37 °C inkubieren
3 x waschen mit PBS
100 µl TMB (SERAMUN) auftragen und 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
mit 100 µl 0,25 M H₂SO₄ abstoppen und bei 450 nm vermessen

ELISA zum Nachweis von NPT II

Siehe Beschreibung NPT II ELISA Kit Firma Biofords.

4.2.5.7 Western Blot

Die Western-Blots wurden im Semidry-Verfahren (Towbin *et al.* 1979) in einer Western-Blotappatur der Firma Carl Roth durchgeführt.

Westernblotpuffer:	-25 mM Tris	TBS:	-50 mM Tris
	-192 mM Glycin		-15 mM NaCl
	-20% (w/v) Ethanol		-1 mM CaCl ₂
			-pH = 7,4

TBST: TBS +0,2% TWEEN

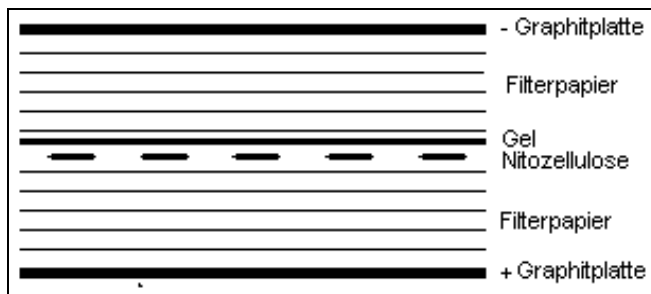


Abb. 4: Aufbau eines Semidry-Western-Blots

Nitrozellulose und Filterpapier werden mit Westernblotpuffer gut getränkt und entsprechend der Abb. 5 in der Blotapparatur angeordnet. Luftblasen müssen ausgerollt werden. Es wird bei 12 V geblottet. Nach 60 Minuten sind die Proteine aus dem Gel auf der Nitrozellulose gebunden (Twobin *et. al.* 1979). Es wird zweimal mit TBS und zweimal mit TBST gewaschen und anschließend werden mit BSA (0,25 mg/ml in TBS) oder Rotiblock (nach Vorschrift) unspezifische Bindungen geblockt. Die Inkubation der Antikörper erfolgt jeweils für 60 Minuten. Nach jedem Antikörper wird fünfmal 15 Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend wird der Blot mit ECL (Amersham) inkubiert. Nach der Inkubation werden durch Schräghalten Reste des ECL-Substrates von der Membran entfernt und die Membran in eine Dokumentenhülle überführt. In einer Dunkelkammer wurde mit der Membran ein Röntgenfilm (Kodak) belichtet, der anschließend entwickelt wurde. Als Größenstandard wurde RotiWesternMark von Carl Roth GmbH verwendet. Die Antikörper waren folgend (Tabelle 6) konzentriert.

Tab. 6: Konzentrationen der Antikörper bei Western-Blots

Antikörper:	Konzentration:
rabbit Anti GFP	1:500 bis 1:2000
rabbit Anti CTXB	1:250 bis 1:500
rabbit Anti VP60	1:1000
SIGMA rabbit anti NPT II	1:2500
Strep-HRP-Konjugat	1:50
SIGMA goat anti rabbit	1:10000 oder 1:20000

Der Primärantikörper gegen NPT II und der sekundäre Maus-anti-Rabbit Antikörper wurden von der Firma SIGMA ALDRICH bezogen. Für alle anderen Nachweis wurden die Antikörper der Firma BIOSERV verwendet.

Problematisch war der niedrige pH-Wert der Proben nach der in vitro Verdauung. Die Antikörper des ELISA binden bei den sauren pH-Werten nicht und das Pepsin ist bei diesen pH-Wert aktiv und würde aufgrund seiner proteolytischen Wirkung die Antikörper abbauen. Deshalb wurde bei den Proben aus der in vitro Verdauung der pH-Wert mit gesättigter TRIS-Lösung auf pH = 8 eingestellt.

4.2.5.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976). Die Messung erfolgte in einer 96er Mikrotiterplatte (Auftrag: jeweils 50 µl Bezugslösung- und Probelösung). Die standardisierte Bezugsreihe wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein im Konzentrationsbereich von 2,5 - 100 µg/ml erstellt. Anschließend wurde zu jeder Probe 200 µl Bradford-Reagenz zugegeben und die Mikrotiterplatte bei 595 nm mit dem Farbspektrometer Synergy HT der Firma BIO-TEK vermessen.

4.2.5.9 TNBS-Assay

Pankreatin und Gallenextrakt stören den ELISA, so dass ein immunologischer Nachweis nicht mehr möglich ist. Der Proteinabbau durch Pankreatin und Gallenextrakt wurde mit dem Nachweis der freien Aminosäuregruppen durch TNBS (TriNitroBenzenSulfonat) bestimmt (Mokrasch *et al.* 1967). Die Methode wurde leicht modifiziert. Zu 80 µl Probe werden 720 µl 0,105 M Na₂B₄O₇ gegeben. Danach mischen, 80 µl TNBS (SIGMA ALDRICH P 2297, 1:6 verdünnt aus 5 % (w/v) → Konzentration: 0,028 M) zugeben und exakt 10 Minuten bei 37°C reagieren lassen. Danach die Reaktion mit 400 µl 4 M HCl stoppen und bei 420 nm vermessen. Mittels einer Standardreihe und Kalibrierungsgeraden aus Glycin verschiedener Konzentrationen kann dann die Menge an freien Aminogruppen ermittelt werden.

4.2.6 Ussing-Kammer Technik

(Mandy Bruch)

Für die Resorptionsstudien wurden vier Ussing-Kammer-Module mit je sechs Ussing-Kammern von „Scientific Instruments Aachen“ verwendet. Die Ussing-Kammer besteht aus einer serosalen und einer mukosalen Halbzelle. Durch diese Bauweise wird das Innere des Darms (luminal, mukosal) durch eine Kammerhälfte und die Blutseite des Darms (serosal) durch die andere Kammerhälfte simuliert. Beide Kammerhälften sind über eine Öffnung mit-

einander verbunden sind. In diese Öffnung wird das Gewebe oder die Zellkultur eingespannt und die in den Kammerhälften enthaltenen Pufferlösungen sind nur durch das Gewebe voneinander getrennt. Durch Zugabe von Substanzen auf einer Seite kann der Transport auf die andere Seite untersucht werden.

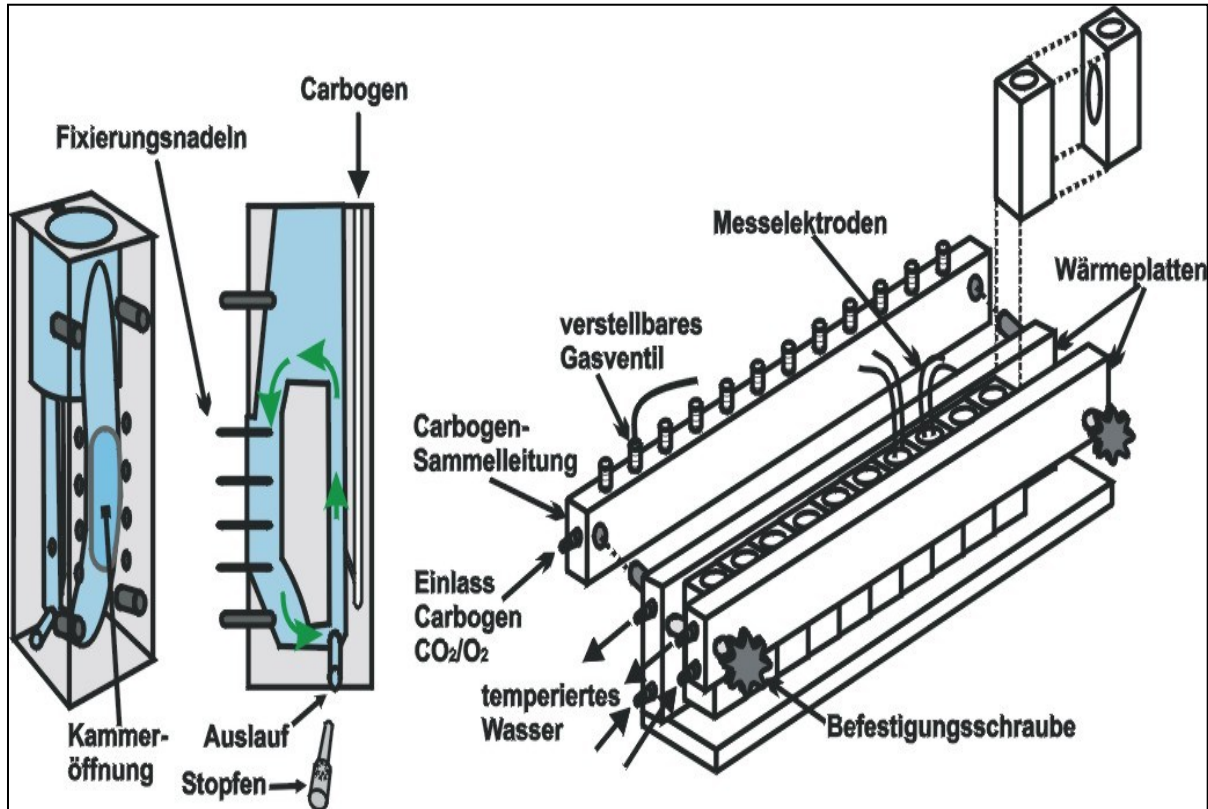


Abb. 5: schematische Darstellung des Ussing-Kammer Systems nach Scientific Instruments (Aachen)

In die Pufferlösungen beider Kammern sind Elektroden eingebracht, welche den Strom und das Potential über dem Gewebe messen. Somit kann der Gewebewiderstand ständig bestimmt werden. Dieser kann als Maßstab für die Intaktheit des Gewebes dienen. Auch die Quantifizierung des Transportes von geladenen Molekülen oder Ionen ist über die Elementarladung möglich ($I = C / t$).

Für Resorptionsstudien wurde lyophilisiertes Pflanzenmaterial mit USSING-Puffer versetzt.

Ussing-Kammer Puffer:	115 mM NaCl	1,2 mM MgCl ₂
	0,4 mM Na ₂ HPO ₄	1,2 mM CaCl ₂
	2,4 mM NaH ₂ PO ₄	5 mM Glucose
	5,0 mM KCl	25 mM KHCO ₃

Die Proteine gehen im Puffer in Lösung und nach Filtration durch Faltenfilter wurde das gewonnene Filtrat in der mukosalen Ussing-Kammerhälfte eingesetzt. Während des Versuches

waren die Kammern auf den Modus „Open circuit“ eingestellt. Über einen Zeitraum von 6 h wurde im Abstand von jeweils einer Stunde aus jeder serosalen Kammer 250 µl Probe entnommen. Dieses Volumen wurde mit Puffer wieder nachgefüllt.

Das Gewebe (terminales Ileum vom Schwein) wurde bei Schlachtungen im Versuchsschlachthaus des Forschungsinstitutes für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) entnommen. Die Tiere waren Börgen der deutschen Landrasse, ca. 180 Tage alt und entstammten den Beständen der Zentralen Eigenleistungsprüfanstalt Jürgenstorf. Das Gewebe wurde sofort nach der Entnahme in eiskalten Puffer mit Indomethacin zum Versuchsstandort transportiert. Das Indomethacin diente zur Unterdrückung der endogenen PGE-Synthese durch das Gewebe (Argenzio und Liacos, 1990; Bliklager et al., 2002).

Dort entfernte man die Muscularis, d.h. der Darm wurde „gestrippt“. Die Präparation, das ‘Strippen’, breitet die grose Darmoberfläche, die durch die Plicae circulares und die Villi dreidimensional verteilt ist, durch Glatten der Plicae circulares auf eine Ebene aus und reduziert damit den luminalen ‘Unstirred layer’ (Lorenz, 2006). Des Weiteren werden serosal die nichtepithelialen Diffusionsbarrieren durch Entfernung der Tunica muscularis und der Tunica serosa minimiert. Der serosale ‘Unstirred layer’ besteht, wie oben genannt, somit nur noch aus Lamina propria, Lamina muscularis mucosae, und der teilweise entfernten Tela submucosa. Die Fehler durch die ‘Unstirred layer’ und die anderen oben beschriebenen Phänomene bewegen sich im Rahmen der ohnehin vorhandenen Mess- und Rechenungenauigkeit, so dass man die Modellvorstellung des Epithels als vernünftige Grundlage für die Interpretation der Daten des in-vitro-Versuches ansehen kann (Kellett, 2001).

Um sicherzustellen, dass auch bis zum Versuchsende die Messungen mit voll funktionsfähigem Gewebe durchgeführt wurden, wird zum Versuchsabschluss die Spannung zwischen den Halbkammern konstant eingestellt („Short circuit“). Treten nach der Zugabe von Theophyllin, das den intrazellulären cAMP-Spiegel simuliert, charakteristische Änderungen des Kurzschluss-Stromes ($I [\mu A/cm^2]$) auf, kann auf eine noch vorhandene physiologische Aktivität des Gewebes geschlossen werden. Es ist anerkannt, dass die Messung des Isc nach Theophyllinzugabe als Vitalitätstest verwendbar ist (Holtug und Skadkavue, 1991).

4.2.7 Gewebeschnitte / Immunohistochemie

Für die Anfertigung von Gewebeschnitten wurden Stücke vom terminalen Ileum des Schweines vor dem Resorptionsversuch und nach dem Versuch aus der Ussing-Kammer entnommen. Diese wurden sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Verarbeitung bei -20° C gelagert. Mit einem Kryostatmicrotom (Firma: Leica) konnte das gefrorene Gewebe in 6-10 µm dicke Stücke geschnitten werden. Bei einer weiteren Versuchsreihe der Schnitte erfolgte

eine Hämatoxilin-Eosin (HE)- Färbung, um die Beschaffenheit des Darmepithels nach der Inkubation in der Ussing-Kammer zu untersuchen.

Dazu wurden diese Gefrierschnitte nach dem Schneiden 5 min zum Antrocknen bei Zimmertemperatur gelagert und anschließend für 5 min in 4%-igem Formol-Calcium fixiert. Anschließend folgte das Wässern 5 min in aqua dest. und daran schloss sich die Kernfärbung mit saurem Chem Mate Hämatoxilin (Firma: DAKO) über 5 min an. Danach werden die Schnitte 20 min unter fließendem Wasser gespült und nochmal 5 min mit aqua dest. gereinigt. Anschließend wird das Zytoplasma mit 0,1%-igem Eosin angefärbt. Die überschüssige Farbe wird mehrmals mit aqua dest. abgespült und danach erfolgt ein Entwässern der Schnitte mit aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100% und Xylol). Nach dem Entwässern werden die Schnitte mit Kanadabalsam oder Histofluid auf Objektträger gebracht.

Für die Klärung der Frage, wie das GFP durch den Darm transportiert wird, wurden die Kryoschnitte mit speziellen Antikörpern gegen GFP angefärbt. Die Schnitte wurden durch 15 min Inkubation mit 4% Paraformaldehydlösung auf einem Objektträger fixiert und anschließend 3x für 5 min mit PBS gewaschen. Beim letzten Waschschritt wird dem PBS 0,1% Triton X zugefügt und die Schnitte wurden nochmals 15 min mit dieser Lösung inkubiert. Um die unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, werden die Bindungsstellen mit einer 10% Ziegenserumlösung (NSG) über 15 min blockiert. Danach wirkt der 1. Antikörper über Nacht bei 4°C in der „feuchten“ Kammer auf die Gewebeschnitte ein. Nach anschließender 3-maliger Waschung mit PBS werden die Schnitte mit dem 2. Antikörper für 1h in der „feuchten“ Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (3 x 10 min) wurde mit Propidium-Jodid (Konz. 1µg/ml, in PBS, 10 min) der Zellkern angefärbt. Die Gewebeschnitte wurden nochmals 2 x 5 min mit PBS und 1 x 5 min mit aqua dest. gespült, danach getrocknet und mit MOWIOL wurde ein Deckgläschen aufgelegt.

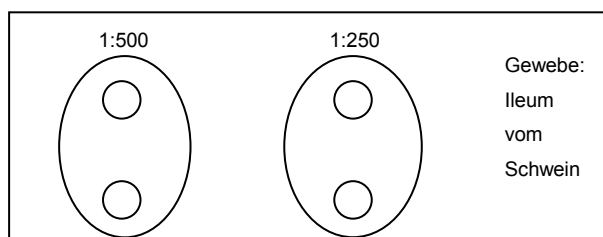


Abb. 6: Belegung des Objektträgers mit 4 Schnitten (2 Schnitte pro Antikörperkonzentration)

4.2.8 Fütterungsversuch

4.2.8.1 Tiermaterial

Die Tiere für den Tierversuch (Verfütterung von Kartoffeln) stammten aus der Schweinezuchtanlage P. Wiechmann und Söhne GbR in Pankelow. Es wurden 18 F1 Hybriden (Deut-

sche Landrasse x Deutsches Edelschwein) im Alter von 80 Tagen verwendet. Bei der Einstellung wogen sie 30 kg bis 35 kg.

4.2.8.2 Futtermittel

Die Tiere wurden acht Tage zur Adaptation mit Vormastfutter (FUGEMA Malchin, Zusammensetzung: Energiegehalt (ME) 13,0 MJ/kg; Rohprotein 17,4%; Lysin 1,05%; Calcium 0,75% und Phosphor 0,55%) gefüttert. Nach einer Woche wurde mit der Verabreichung von isogenen Kartoffeln (A-WT) begonnen, um die Tiere an das neue Futter (rohe, gehäckselte Kartoffeln) zu gewöhnen. Eine Ration bestand aus 0,6 kg Vormastfutter vermengt mit 1 kg rohen gehackten Kartoffeln. Die Tiere sind zweimal am Tag gefüttert worden. Diese Ration ist von den Schweinen komplett aufgenommen worden. Nach drei Wochen Fütterung mit isogenen Kartoffeln wurde mit der Verfütterung der transgenen Kartoffeln begonnen.

4.2.8.3 Haltung der Tiere

Die Tiere wurden in Einzelboxen mit Doppelspaltenboden in der Versuchsanlage „Friedrich Harms“ der Universität Rostock in Dummerstorf gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

4.2.8.4 Durchgeführte Untersuchungen

Im Hauptversuch bestand die Ration für je 6 Tiere aus dem Vormastfutter mit den Kartoffeln A-WT, A-N2 und A-CY. Die Tiere wurden am Tag 1 des Hauptversuches, direkt vor der ersten Fütterung geblutet, weitere Blutabnahmen erfolgten an jedem Versuchstag zwei Stunden nach der Morgenfütterung. Das Blut wurde zur Vollblutgewinnung in heparinisierte Röhrchen (SARSTEDT) und zur Serumgewinnung in unbehandelte Röhrchen abgefüllt. Die Serumgewinnung erfolgte durch Zentrifugation des geronnenen Blutes.

Die Firma LABOKLIN untersuchte das heparinisierte Vollblut (kleines Blutbild) und das Serum (großes Screening). Das Serum wurde außerdem auf das Vorhandensein von NPTII durch Durchführung eines ELISAs getestet. Am achten Tag erfolgte die Tötung der Tiere und Chymusproben aus Magen und allen Abschnitten des Darmes wurden entnommen. Anhand dieser Proben erfolgte die Überprüfung der in vitro Verdauung durch die Bestimmung der Verdaulichkeiten (Weender-Parameter) in vivo und deren anschließender Vergleich untereinander.

4.3 Statistik

Die Bestimmung von Messwerten erfolgte als Doppelbestimmung. Bei Abweichungen außerhalb der Fehlergrenzen der Methode wurde ein weiterer Wert bestimmt. Um Parameter aus einer graphischen Darstellung zu entnehmen, wurden Modelle unter Verwendung von SIGMA PLOT erstellt. Aus diesen konnten die Parameter entnommen werden. Zur Prüfung auf Signifikanz wurde beim Vergleich zweier Mengen ein t-Test durchgeführt. Zwei Mengen von Messwerten gelten bei $p < 0,05$ als signifikant von einander verschieden. Beim Vergleich von mehreren Datenreihen sind die signifikanten Abweichungen mittels einer einfaktoriellen Anova untersucht worden. Der T-Test und die einfaktorielle Anova erfolgte unter Verwendung von SIGMA STAT.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung der in vivo Verdauung

(Andre Kacholdt)

5.1.1 Bestimmung der natürlichen Enzymaktivitäten

5.1.1.1 Bestimmung der Speichelamylaseaktivität

Es wurden die Aktivitäten der α -Amylase aus dem Speichel von Menschen und Schweinen (Minipigs und Masthybriden) bestimmt. Um eventuell auftretende Unterschiede vor und nach der Nahrungsaufnahme zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung bei den Minipigs sowohl vor (F-) als auch nach (F+) der Nahrungsaufnahme.

Tab 7: verschiedene Speichelaktivitäten

Individuum	Mensch	Minipig (F-)	Minipig (F+)	MH-Ferkel
1	27,25	6,59	8,57	6,74
2	34,13	5,59	6,74	9,72
3	32,05	6,28	15,07	7,66
4	33,48	9,49	17,75	12,86
5	32,76	5,29	4,98	5,82
6	25,74	2,38	10,10	16,07
7	30,61	3,37	11,56	9,64
8	32,55	7,04	9,18	14,00
MW	31,07 ^a	5,75 ^b	10,49 ^c	10,31 ^{b,c}
S.E.	1,00	0,73	1,4	1,21

Die Messwerte weisen nur geringe Abweichungen auf, wobei die Werte der Schweine größeren Schwankungen unterliegen als die humanen Werte.

Es treten signifikante Unterschiede zwischen den humanen Aktivitäten und den Aktivitäten im Speichel der Schweine auf ($P > 0,001$). Dagegen unterscheidet sich die Speichelaktivität der Minipigs und die der Masthybriden nicht signifikant. Die Fütterung hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Enzymaktivität im Speichel.

5.1.1.2 Bestimmung der Pepsinaktivität

Direkt nach der Schlachtung von 10 Tieren (Börger, dt. Landrasse, Alter: 180 Tage, kommerzielle Schlachtung) wurden Proben aus deren Magen entnommen und die Pepsinaktivität nach Anson (1983) bestimmt (Tab. 8). Die Werte der Proben stimmen überein. Bei Probe 2 war der Magensaft durch Blut verunreinigt, was zu einem pH-Wert von 6,3 und somit zur Verringerung der Aktivität des Pepsins führte (63 U/ml). Deshalb wurde dieser Wert bei der Bestimmung nicht berücksichtigt.

Tab. 8: Pepsinaktivitäten in Units/ml bestimmt nach Anson (1938)

Tier	1	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	S.E.
Units	183,3	145,9	197,6	240,5	177,1	144,1	161,7	291,5	184,8	178,7	18,3
pH-Wert	0,17	1,03	3,06	1,10	2,36	3,07	0,45	2,03	3,76	1,89	0,4

5.1.2 Bestimmung des in vivo Abbaus von Futtermitteln

5.1.2.1 In vivo Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter

Der Abbau von Futtermitteln wird durch die Menge der resorbierten Anteile der Fraktionen Rohasche (RA) und Rohprotein (RP) mittels scheinbarer Verdaulichkeiten beschrieben.

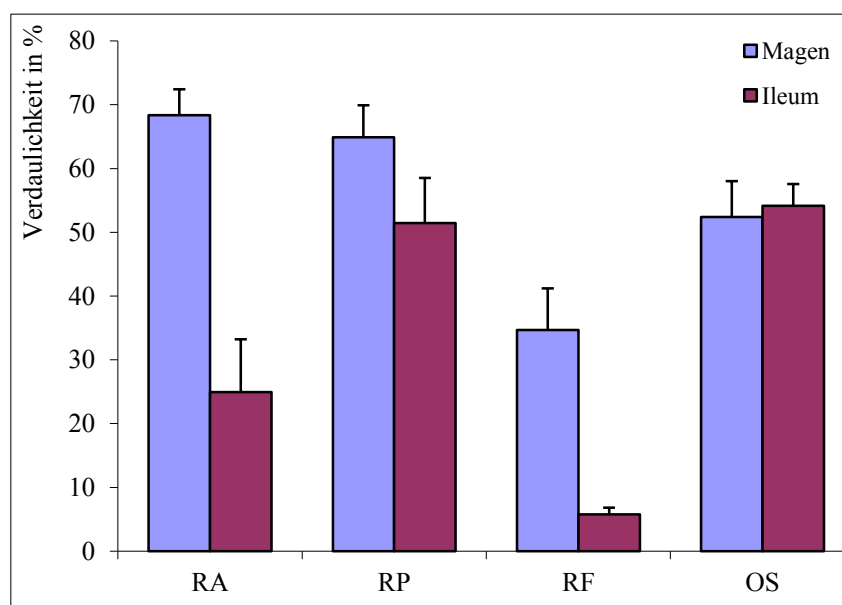


Abb. 7: scheinbare Verdaulichkeiten der Fraktionen von Jungsauenaufzuchtfutter, (RA-Rohasche, RP-Rohprotein, RF-Rohfaser, OS-Organische Substanz)

Mit Jungsauenaufzuchtfutter (pelletiertes Mischfutter) wurden zehn Schweine (Landrasse; Alter ca. 180 Tage) eine Woche lang gefüttert. Die Tiere wurden ungenüchert geschlachtet und aus den verschiedenen Teilen des Verdauungstraktes (Magen, Duodenum, Jejunum und

Ileum) Proben entnommen. Die Proben wurden zentrifugiert. Im Pellet wurden die scheinbaren Verdaulichkeiten von Rohasche, Rohprotein und Rohfaser bestimmt und zum Vergleich von in vitro und in vivo Verdauung herangezogen.

Die Bestimmung erfolgt unter Verwendung eines Markers, der in 4 M HCl unlöslichen Rohasche. Diese Werte waren bei den in vivo Proben starken tierindividuellen Schwankungen unterworfen (0,46 %TS bis 1,45 %TS), während die Wiederholungen innerhalb einer Probe recht einheitlich waren. Auffällig ist die niedrige scheinbare Verdaulichkeit der Ileumproben im Vergleich zu den Proben aus dem Mageninhalt. Anhand der SURA konnte ein Masseverlust durch die Verdauung von 60 % festgestellt werden.

5.1.2.2 In vivo Abbau von frischen Kartoffeln (Sorte Albatros)

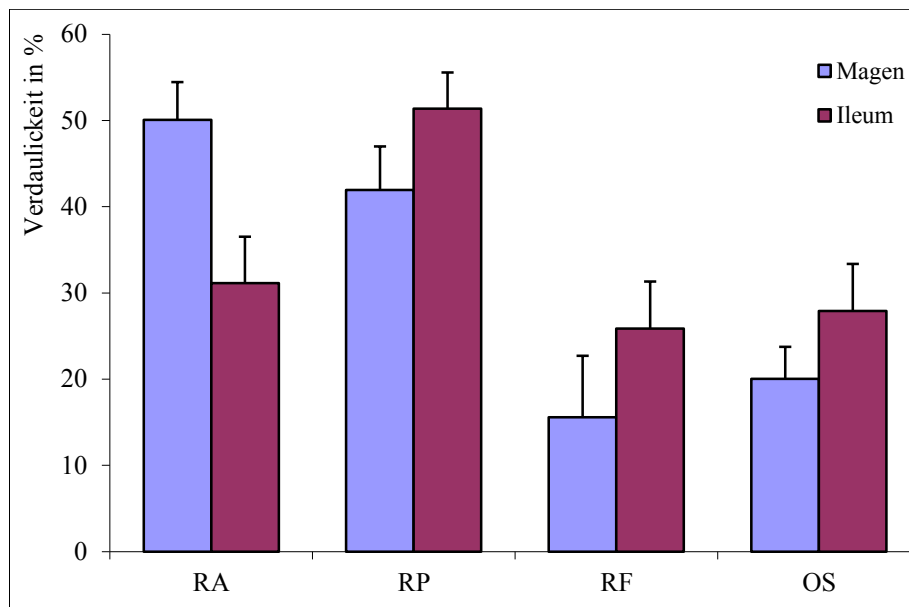


Abb. 8: scheinbare in vivo Verdaulichkeiten der Fraktionen von Kartoffeln im Magen und Ileum von Schweinen
(RA-Rohasche, RP-Rohprotein, RF-Rohfaser, OS-organische Substanz)

Im Rahmen eines Fütterungsversuches (Kapitel 4.2.8) wurden je 18 Schweine mit einem Gemisch aus rohen Kartoffeln und Vormastfutter gefüttert. Die Tiere wurden geschlachtet und aus den verschiedenen Teilen des Verdauungstraktes Proben entnommen. Die Proben wurden zentrifugiert und im Pellet die scheinbaren Verdaulichkeiten von Rohasche, Rohprotein und Rohfaser bestimmt und zum Vergleich von in vitro und in vivo Verdauung herangezogen.

Die Verdaulichkeiten im Ileum sind hier, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der in vivo Verdauung von Jungsauenaufzuchtfutter höher als im Magen. Anhand der SURA konnte im Ileum ein Masseverlust durch die Verdauung von 17 % festgestellt werden.

5.2 Untersuchungen zur Verdauung in vitro

5.2.1 Untersuchung des in vitro Abbaus durch α -Amylase

Die enzymatische Spaltung der drei Hauptnahrungsbestandteile (Polysaccharide, Proteine und Fette) durch die Verdauungsenzyme wurde in vitro quantitativ erfasst. Der Einfluss von Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten auf den Abbau der Futter ist untersucht worden.

Desweiteren wurde die Notwendigkeit der Simulation des Aufschlusses mit α -Amylase betrachtet, da in vielen Simulationen dieser Schritt weggelassen wird.

5.2.1.1 Untersuchung der Notwendigkeit der Simulation des Abbaus durch α -Amylase

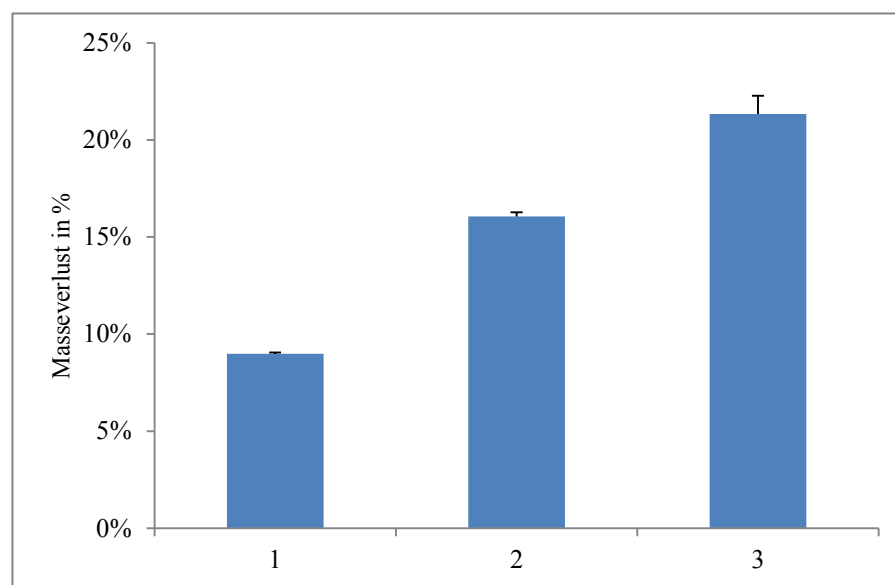


Abb. 9: Abbau (%) von Jungsauenaufzuchtfutter durch Pepsin mit und ohne vorherige Amylaseinkubation

- | | |
|---|---|
| 1 | Masseverlust durch sofortige Einwirkung von Pepsin |
| 2 | Masseverlust durch Einwirkung von HCl mit vorheriger α -Amylaseinkubation |
| 3 | Masseverlust durch Einwirkung von HCl/Pepsin mit vorheriger α -Amylaseinkubation |

In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass die Einwirkung von α -Amylase einen signifikanten Einfluss auf den weiteren Abbau durch HCl bzw. HCl und Pepsin hat. Daher scheint ein Weglassen dieses Schrittes in der Simulation der Verdauung nicht gerechtfertigt zu sein.

5.2.1.2 Einfluss von Einwirkzeit und Enzymkonzentration

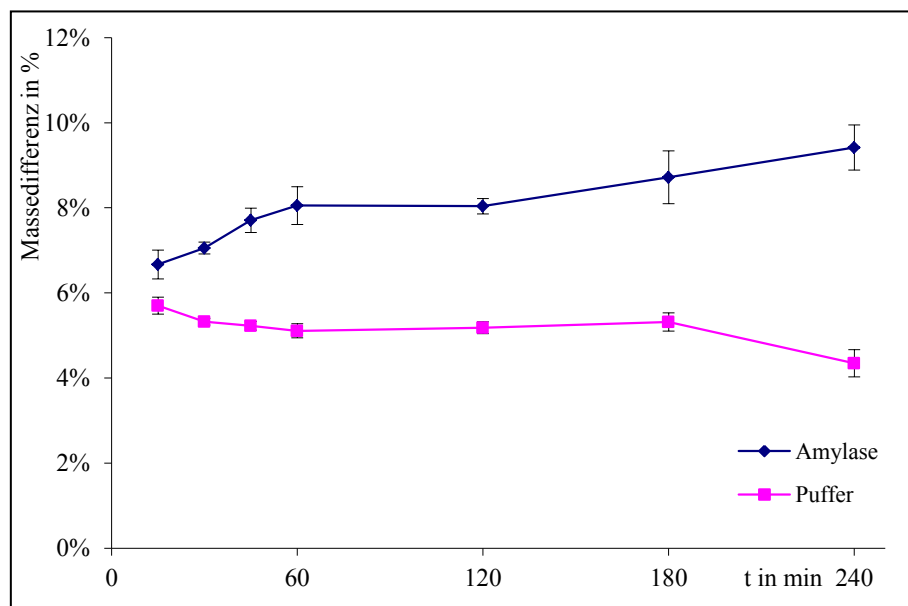
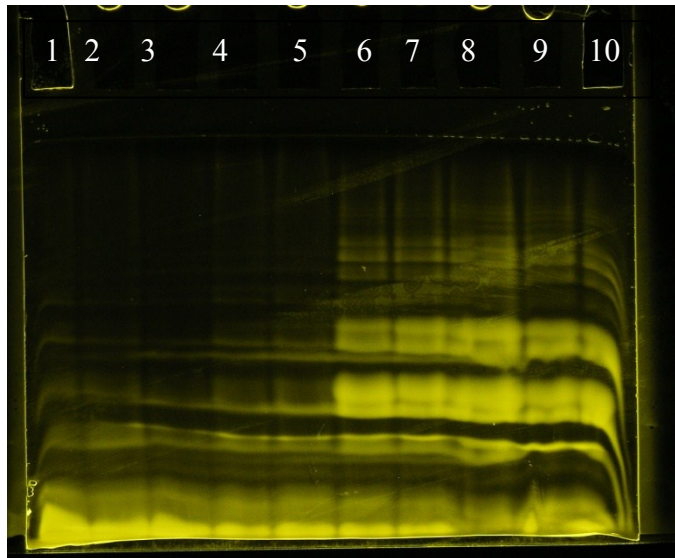


Abb. 10: Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch Amylase und Amylasepuffer

Bei der Inkubation von Jungsauenaufzuchtfutter mit Amylasepuffer mit und ohne α -Amylase kommt es zu einer signifikanten Masseverringern durch die Einwirkung von α -Amylase. Die bei der Inkubation mit Puffer ohne Enzym auftretende Massedifferenz wird durch das Auswaschen von Salzen und kleinen Partikeln verursacht, welche die Poren des Glasfiliertiegels passieren können. Anhand dieser einfachen gravimetrischen Methode lässt sich die Bedeutung der α -Amylase für den Masseverlust verdeutlichen. Daher ist diese gravimetrische Methode auch für die Untersuchung weiterer gravimetrisch bestimmbarer Abbauschritte nutzbar.

Um den Abbau des Futters auch auf molekularer Ebene nachzuweisen, erfolgte der Nachweis der entstehenden Oligosaccharide durch Auftrennung nach ihrer Größe im elektrischen Feld unter Verwendung eines FACE-PA-Gels. In Abbildung 11 ist in den Spuren 6 bis 10 die Entstehung von Oligosacchariden durch das Einwirken von α -Amylase zu sehen. Mono- und Disaccharide sind auch ohne die Einwirkung von α -Amylase zu sehen, da diese Zucker im Futtermittel enthalten sind. Beim Einwirken von enzymhaltigem Puffer sind aber schon nach einer Minute höherkettige Oligosaccharide ($n > 3$) entstanden. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Oligosaccharide durch die Aktivität der α -Amylase aus dem Substrat freigesetzt werden. Schon nach einer Minute scheint sich aber die Konzentration der niederkettigeren Oligomere ($n = 2$ bis 5) nicht mehr zu ändern, während sich bis zur Spur acht eine Zunahme der hochkettigen Oligomere ablesen lässt. In den Spuren 1 bis 5 sind Reaktionsansätze ohne Amylase aufgetragen. Es ist keine Veränderung in der Zusammensetzung der Koh-

lenhydrate zu erkennen. Deshalb wird angenommen, dass die Ursache der Unterschiede das Enzym α -Amylase ist.



Spur 1: ohne Amylase nach 1 Minute
 Spur 2: ohne Amylase nach 2 Minute
 Spur 3: ohne Amylase nach 3 Minuten
 Spur 4: ohne Amylase nach 4 Minuten
 Spur 5: ohne Amylase nach 5 Minuten
 Spur 6: mit Amylase nach 1 Minute
 Spur 7: mit Amylase nach 2 Minuten
 Spur 8: mit Amylase nach 3 Minuten
 Spur 9: mit Amylase nach 4 Minuten
 Spur 10: mit Amylase nach 5 Minuten

Abb. 11: Entstehung von Oligosacchariden im Überstand von Jungsauenaufzuchtfutter nach der Inkubation mit α -Amylase

5.2.2 Bestimmung des Abbaus durch Pepsin und Salzsäure

5.2.2.1 Zeitliche Stabilität von Pepsin

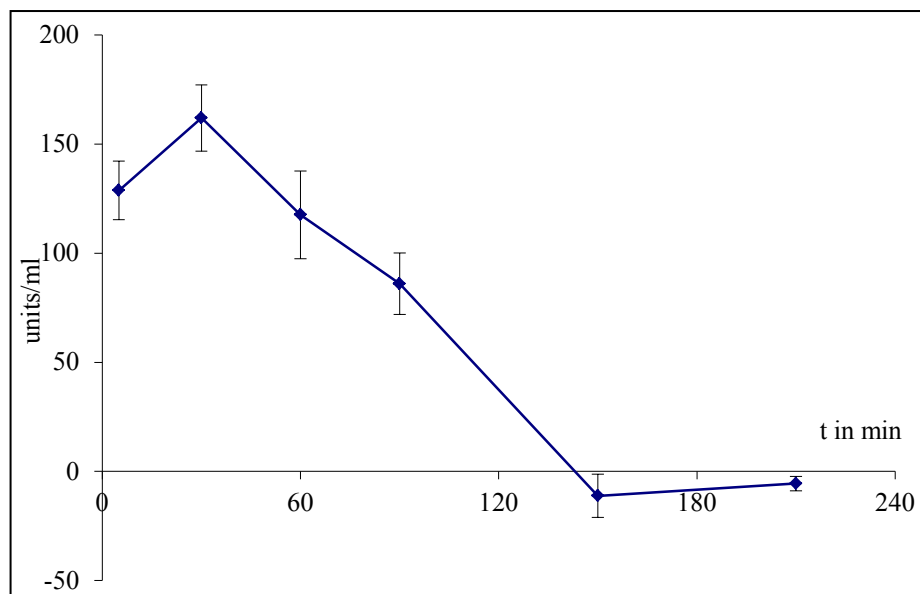


Abb. 12: zeitliche Stabilität von Pepsin gemessen in Units /ml

Die Protease Pepsin ist nicht lange stabil. Schon nach einer Stunde beginnt die Aktivität signifikant abzufallen und nach 2,5 h ist das Pepsin komplett inaktiv. Die Ursache könnte im Selbstabbau des Enzymes liegen. Deshalb sind Inkubationszeiten von mehr als zwei Stunden nicht sinnvoll, wenn nicht alle zwei Stunden das Pepsin erneuert wird.

5.2.2.2 Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch Pepsin/HCl

Der Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch HCl und Pepsin-HCl lässt sich ebenfalls durch das beschriebene gravimetrische Verfahren untersuchen

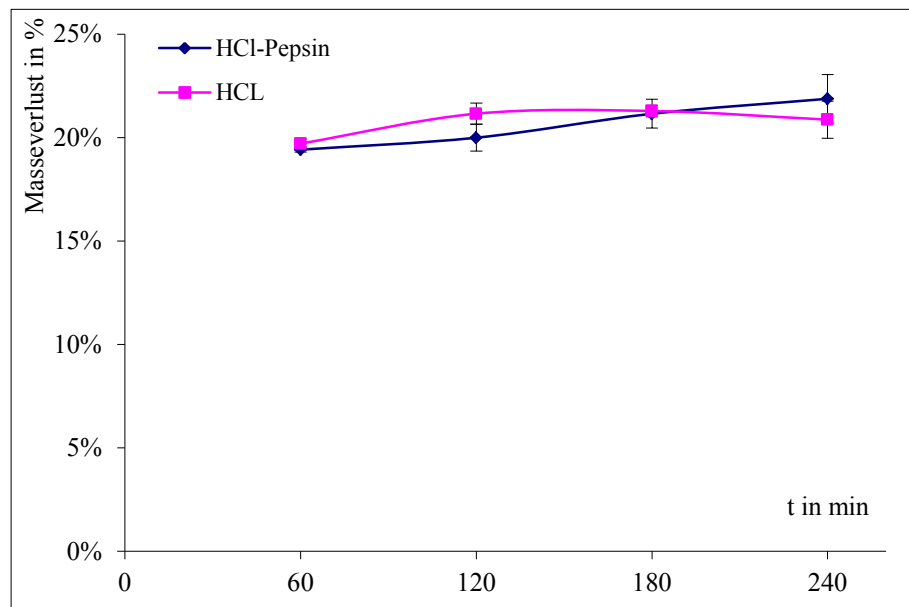


Abb. 13: Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch Pepsin-HCl über einen Zeitraum von 240 min

Die Messwerte sind über einen Zeitverlauf von 240 min sehr homogen. Auffällig ist, dass die Anwesenheit von Pepsin keinen Einfluss auf den Masseverlust hat. Er liegt konstant bei ca. 20 % und ändert sich nach dem Ein-Stunden-Wert im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr. Der Masseverlust ist somit als Folge des Aufschlusses der Salzsäure zu verstehen (Abbildung 13). Um aber den eigentlichen Einfluss des Pepsins auf die im Futter enthaltenen Proteine zu verdeutlichen, wurde die Freisetzung von Stickstoff in die flüssige Phase des Verdauungsansatzes, als Folge der Spaltung von Proteinen durch Pepsin, untersucht. Bei der Bestimmung des nach den einzelnen Abbauschritten gelösten Stickstoffs ist zu erkennen, dass Wasser auch einen kleinen Teil des Stickstoffes zu lösen vermag (Abbildung 14). Dabei handelt es sich um die in Wasser löslichen Anteile des Futtermittels (z.B. Salze) und die Partikel, die klein genug sind, die Poren der Filtertiegel zu passieren. Die Freisetzung von Stickstoff bei α -Amylase Zugabe ist nicht signifikant verschieden zur alleinigen Zugabe von Wasser (H_2O).

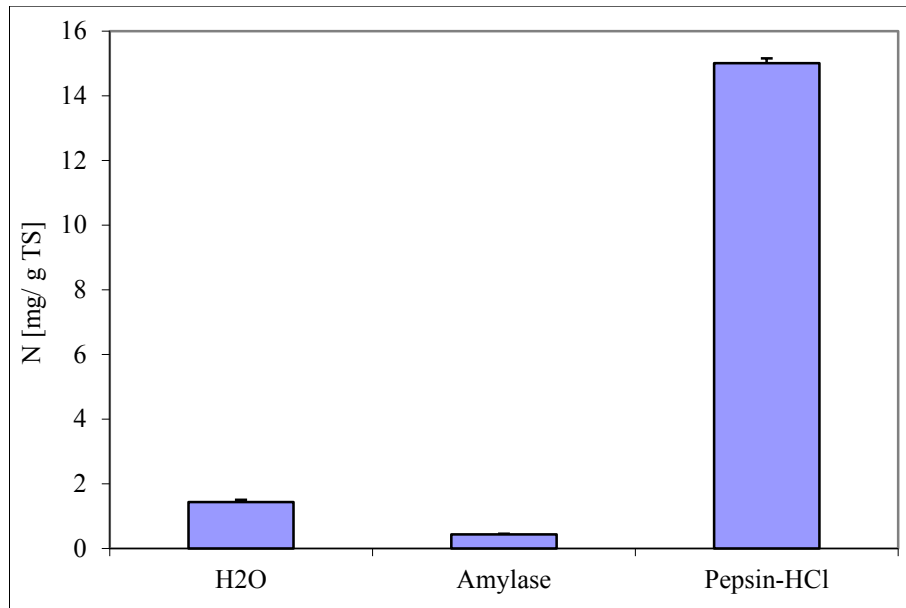
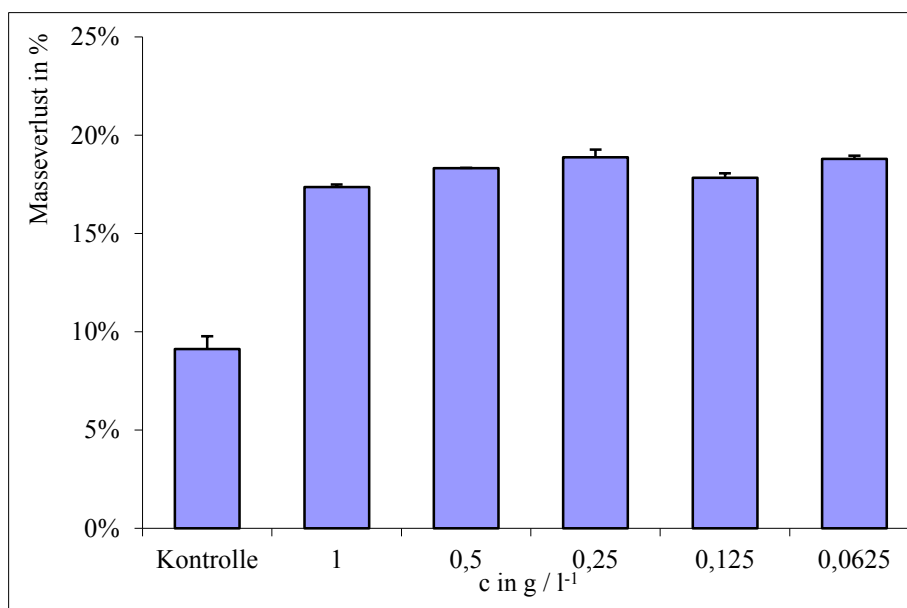


Abb. 14: Freisetzung von Stickstoff in die flüssige Phase

Auch die Freisetzung von Stickstoff durch die Zugabe von Wasser und α -Amylaselösung liegt an der Herauslösung bestimmter Anteile des Futtermittels (z.B. Salze) und es sind ebenfalls die Partikel, die die Poren der Filtertiegel passieren. Von einer „echten“ Freisetzung von Stickstoff durch α -Amylase kann nicht ausgegangen werden.

5.2.2.3 Einfluss der Pepsinkonzentration

Nach 30 Minuten Inkubation mit α -Amylase erfolgte die Inkubation mit Pepsin und HCl. Zur genaueren Bestimmung des Pepsineinflusses auf den Masseverlust wurde mit verschiedenen Pepsinkonzentrationen bei gleicher Konzentration an HCl gearbeitet.

Abb. 15: Masseverlust durch verschiedene Pepsinkonzentrationen (g* l⁻¹)

Die höchste Pepsinkonzentration betrug 1 g/l. Es zeigte sich überraschenderweise keinerlei Einfluss der Pepsinkonzentration auf den Masseverlust (Abbildung 15). Dieser beruht nur auf der Wirkung der HCl, in der das Pepsin gelöst ist. Als Kontrolle diente ein 30 Minutenansatz mit α -Amylase. Die wesentlichen, durch Pepsin verursachten Abbauschritte, erfolgen erst nach dem Aufschluss durch die HCl. Um diesen Abbau verdeutlichen zu können, muss die flüssige Phase untersucht werden.

5.2.2.4 Abbau von BSA durch Pepsin/HCl

Da der Abbau von Proteinen durch Pepsin nicht gravimetrisch erfasst werden kann, mussten die Reaktionsprodukte direkt in der flüssigen Phase nachgewiesen werden. Bei der Spaltung von Proteinen durch Pepsin entstehen aus einem Protein mehrere Polypeptide. Eine Möglichkeit die Zunahme der Polypeptide nachzuweisen, ist die Detektion der freien endständigen Aminosäuren mit TNBS (Trinitrobenzolsulfonsäure). Zur Etablierung des Verfahrens wird dabei zunächst reines Protein (BSA, Bovine Serum Albumin) verwendet, da hier die freien Aminogruppen nur aus dem Protein stammen können. So sollen außerdem andere Verbindungen (Zucker), die den Nachweis stören könnten, ausgeschlossen werden.

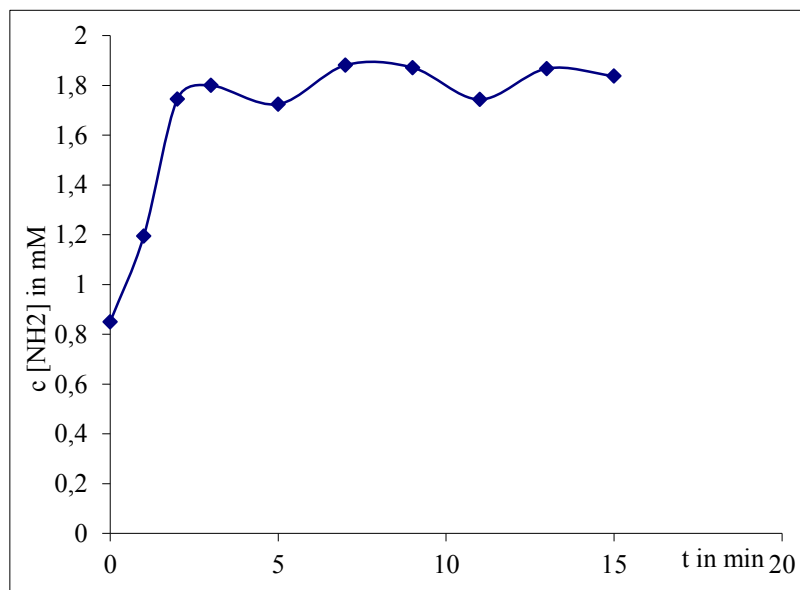


Abb.16: Zunahme der freien NH₂-Gruppen beim Abbau von BSA durch Pepsin

Bei Abbau von BSA durch Pepsin ist deutlich zu erkennen, dass die Konzentration der freien Aminogruppen nur wenige Minuten ansteigt, und danach konstant bleibt. Der Abbau von BSA durch Pepsin ist nach wenigen Minuten beendet.

5.2.2.5 Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch mehrmalige Pepsinzugabe

Bedingt durch den schnellen Aktivitätsverlust von Pepsin (siehe Abb. 17) wurde der Versuch an die natürlichen Bedingungen im Magen angepasst und eine permanentere Pepsinzugabe simuliert.

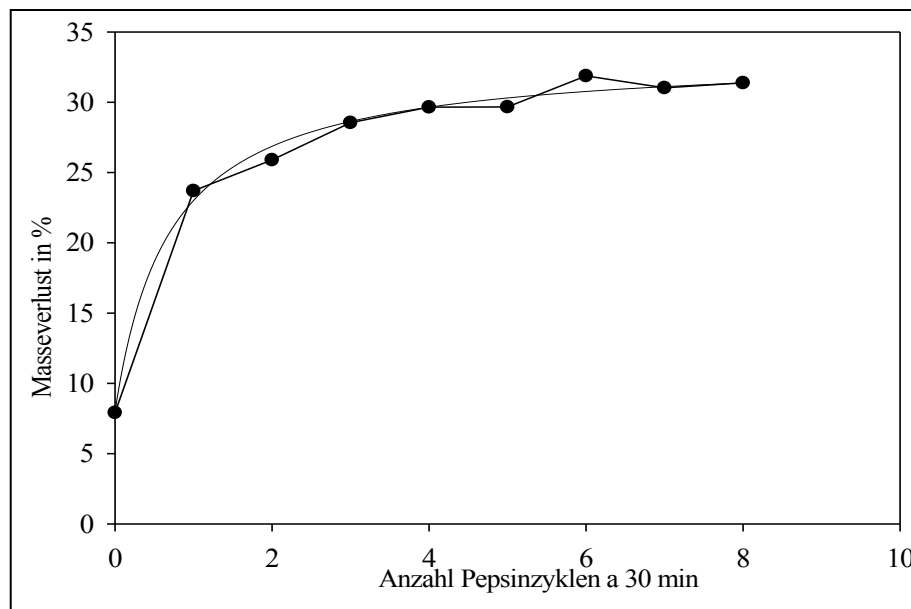


Abb. 17: Masseverlust an Jungsauenaufzuchtfutter durch mehrmalige Zugabe von Pepsin

Nach jeder Pepsinzugabe wurde 1 h inkubiert. Als Kontrolle diente ein 30 Minutenansatz mit α -Amylase. Dadurch konnte der Masseverlust immer weiter erhöht werden. Mit steigender Anzahl an Zugabeintervallen von Pepsin fällt die Zunahme des Masseverlustes aber immer geringer aus. Es kann über ein mathematisches Modell ein maximal erreichbarer Masseverlust errechnet werden und auch die dafür nötige Anzahl an Pepsinzugaben.

5.2.3 Bestimmung des Abbaus durch Pankreatin und Gallenextrakt

5.2.3.1 Aufschluss durch Pankreatin und Gallenextrakt

Da durch Pankreatin und Gallenextrakt die Poren der Glasfiltertiegel verstopfen, wurde die Methode zur Bestimmung des Aufschlussgrades modifiziert. Die Versuche wurden in 50 ml Zentrifugenröhren durchgeführt. Nach jedem Abbauschritt wurde die flüssige Phase abzentrifugiert und neue Enzymlösung zugegeben. Nach dem letzten Verdauungsschritt (Pankretin und Galle) wurde der „unverdaute Rest“ bei 105 °C getrocknet und zurückgewogen.

Tab. 9: Masseverlust durch Pankreatin / Gallenextrakt im Vergleich zu den anderen Verdauungsschritten

Verdauungsschritt	Amylase	Pepsin	Pankreatin/Galle
Masseverlust	10 %	35 %	45 %

Durch die Zugabe von Pankreatin und Gallenextrakt kommt es zu einem weiteren Aufschluss bzw. Abbaus des Futtermittels. Dies wird am Masseverlust deutlich, der auf 45 % steigt (Tabelle 9).

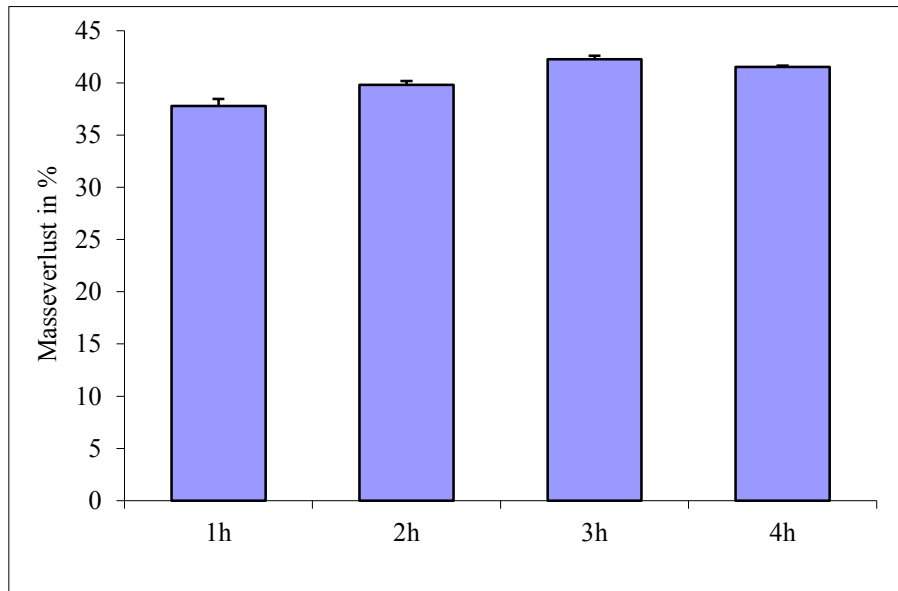


Abb. 18: Masseverlust an Jungsauenaufzuchtfutter durch Einwirkung von Pankreatin und Galle

Beim zeitlichen Verlauf des Aufschlusses durch Pankreatin und Galle kann nach drei Stunden kein Anstieg mehr festgestellt werden (Abbildung 18).

5.2.3.2 Qualitativer Nachweis des Fettabbaus

Bei der Spaltung von Triglyceriden durch die pankreatischen Enzyme entstehen freie Fettsäuren und Glycerin. Während sich das Glycerin im wässrigen Ansatz löst, trifft das für die freien Fettsäuren nicht zu. Deshalb sollten diese in der festen Fraktion der Zentrifugation zu finden sein. Dort befinden sich auch die unabgebauten Fette. Diese und die freien Fettsäuren können durch Extraktion mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden. Allerdings handelt es sich hier nur um einen qualitativen Nachweis, da eine genaue Quantifizierung der Abteile freier Fettsäuren nicht möglich ist (Abbildung 19).

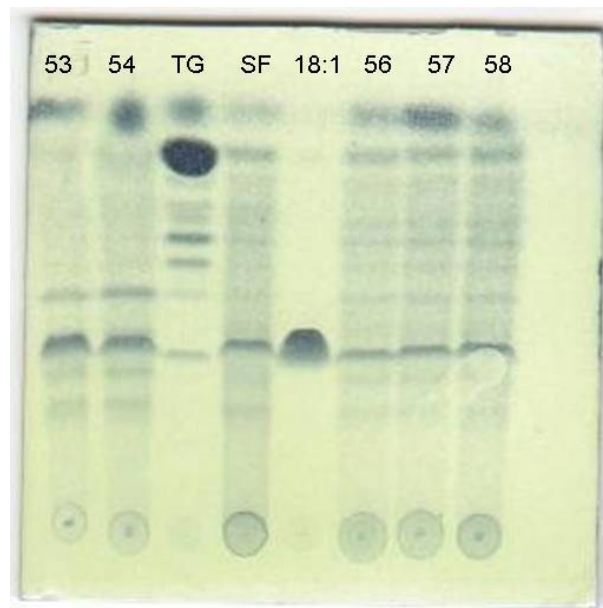


Abb. 19: Dünnschichtchromatographie von Rohfettextrakten aus Jungsauenaufzuchtfutter

Es wurden Rohfettextrakte aus den oben beschriebenen Versuchsansätzen (in vitro Verdau mit und ohne Enzyme (5 μ l) oder Fettsäurestandards (2 μ l; je 2 μ g/ μ l) aufgetragen.

53 und 54: in vitro Verdau	18:1: Ölsäure als freie C-18 Fettsäurestandard
56, 57, 58: in vitro Verdau ohne Enzyme	TG: Olivenöl als Triglyceridstandard
SF: Jungsauenaufzuchtfutter unbehandelt	

Deutlich zu sehen ist das Verschwinden (zumindest eine Abnahme) der Triglyceridbande bei den Proben 53 und 54 (in vitro Verdauung). In diesen Proben sind die freien Fettsäuren stärker vertreten als beim unbehandelten Jungsauenaufzuchtfutter und den Ansätzen ohne Enzym. Es kann davon ausgegangen werden, dass alle frei zugänglichen Fette des Schweinefutters zu Glycerin und Fettsäuren abgebaut worden sind. Dabei können die Fettsäuren noch nachgewiesen werden, da sie sich nicht im wässrigen Medium lösen. Das Glycerin löst sich im Versuchsansatz und wird bei der Zentrifugation entfernt.

5.2.3.3 Quantitativer Nachweis des Fettabbaus

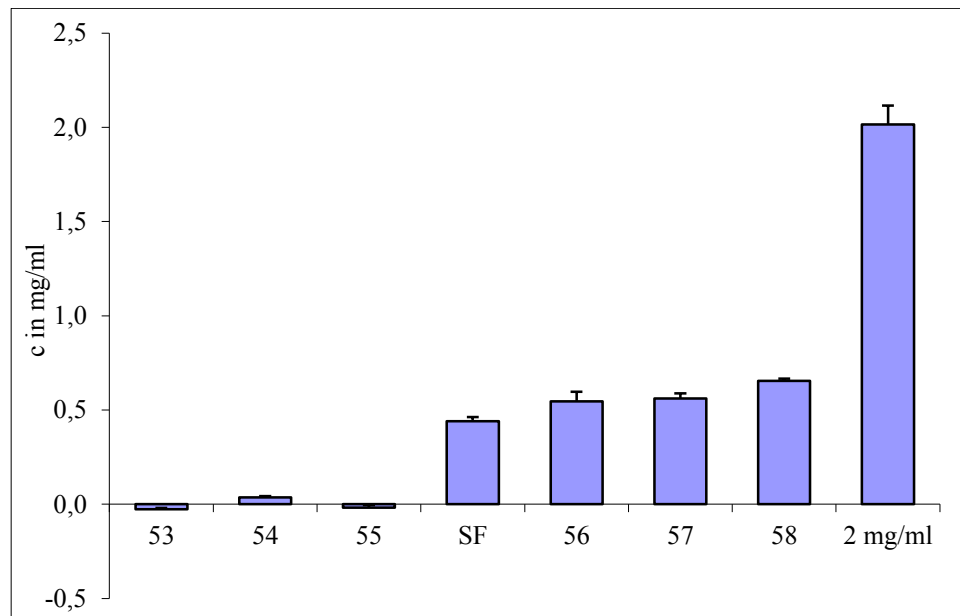


Abb. 20: Gehalt an Triglyceriden im Rohfettextrakt

53, 54, 55: in vitro Verdau

SF: Schweinefutter unbehandelt

56, 57, 58: in vitro Verdau ohne Enzyme

2 mg/ml: Standard (c = 2 mg/ml)

In der Dünnschichtchromatographie konnten erste Tendenzen zum Abbau von Fetten gezeigt werden. Die nichtabgebauten Triglyceride des Futtermittels und der Proben aus den Ansätzen ohne Enzyme konnten auch quantifiziert werden. Dabei werden die Triglyceride gespalten und das Glycerin enzymatisch nachgewiesen. Bei den verdauten Proben hat sich das Glycerin im wässrigen Medium gelöst und ist entfernt worden.

Es ist zu sehen, dass die Rohfettfraktionen der in vitro Verdauung mit Enzymen (ivV) keine Triglyceride mehr enthalten. Die Rohfettfraktionen der Ansätze mit Enzymen unterschieden sich signifikant von den Versuchsansätzen ohne Enzymzusatz und der Rohfettfraktion aus dem unbehandelten Futter. Der Standard dient als Kontrolle des Fehlers der Methode.

5.2.3.4 Bestimmung der Einwirkzeit von Pankreatin Galle mit Trinitrobenzoesäure (TNBS)

Der weitere Abbau mit Pankreatin und Gallenextrakt kann nicht durch Masseverlust bestimmt werden. Deshalb erfolgt der Nachweis wieder über die Bestimmung der freien Aminogruppen in der flüssigen Phase des Pankreatin/Gallenextrakt - Reaktionsansatzes. Im Gegensatz zum Abbau der Proteine durch Pepsin ist die Reaktion bei Zugabe von Pankreatin / Gallenextrakt nicht nach wenigen Minuten beendet, sondern dauert mehrere Stunden an.

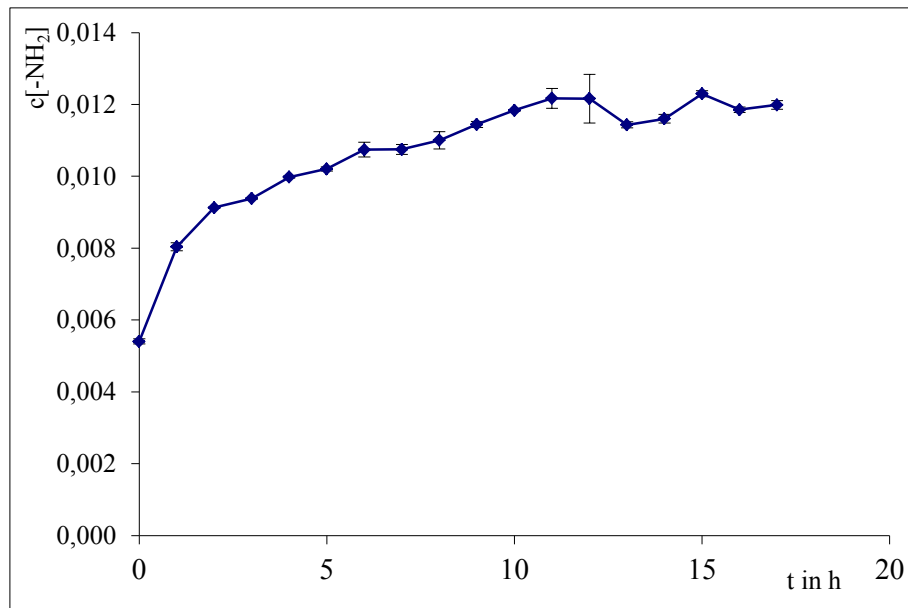


Abb. 21: Zunahme der freien -NH₂ Gruppen aus BSA durch Pankreatin

Um nochmal alle Abbauschritte von Proteinen deutlich sichtbar zum machen, wurde Milchpulver (BSA) der kompletten in vitro Verdauung, d.h. Inkubation des Milchpulvers nacheinander mit α -Amylase, Pepsin und Pankreatin / Gallenextrakt unterzogen.

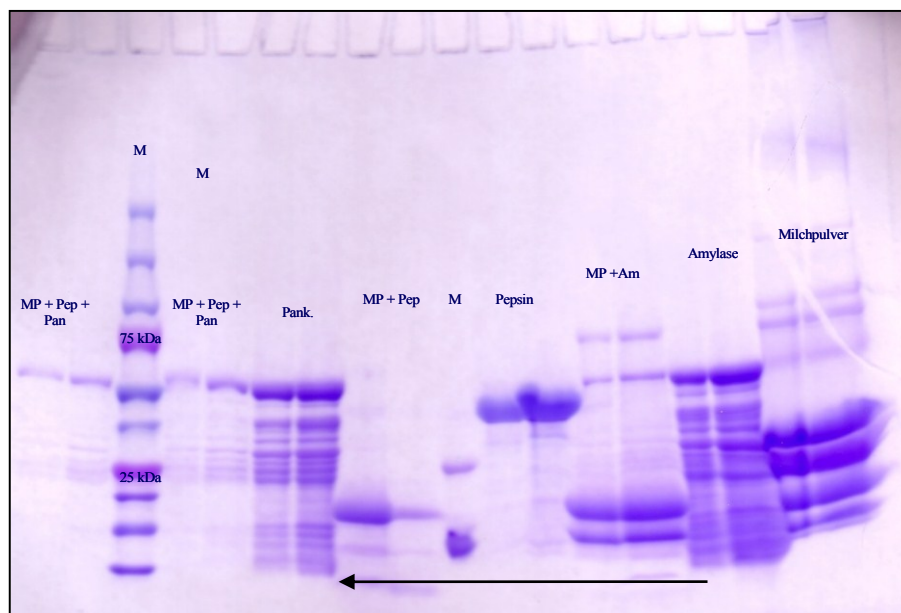


Abb. 22: Abbau von Milchpulver durch Amylase, Pepsin-HCl und HCl

MP: Milchpulver; M: Marker; Pep: Pepsin; Pank: Pankreatin
Verdauungsrichtung: siehe Pfeil

In Abbildung 22 sind jeweils Proben vom Ende der einzelnen Verdauungsschritte auf einem Gradientengel (20% - 4% Acrylamid) aufgetragen. Es ist der gesamte Abbau der Proteine, die im Milchpulver enthalten sind, direkt zu sehen (Spur: MP + Pep + Pan). Es ist deutlich zu

erkennen, dass es zu einem Abbau der Proteine durch Pepsin kommt. Auch die vielen verschieden großen Proteine, die in der α -Amylase vorhanden sind, werden durch Pepsin abgebaut. Dabei entstehen drei größere Fragmente. Die ebenfalls entstehenden Polypeptide sind aber zu klein, um in einem 4%igen Gel erfasst zu werden.

Im Pankreatin sind, wie schon bei der α -Amylase noch viele andere Proteine enthalten, die jedoch durch Pepsin und Pankreatin abgebaut werden. Nach der dreistündigen Einwirkung von Pankreatin sind keine Proteine des Substrates (Milchpulver) mehr zu erkennen. Die wenigen Banden, die noch zu sehen sind, sind Bestandteile des Pankreatins, da sie in der Größe sehr stark mit dem aufgetragenen Pankreatin übereinstimmen.

5.2.4 in vitro Abbau von Futtermitteln

5.2.4.1 in vitro Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter

Neben den Verdaulichkeiten wurde beim in vitro Abbau der freigesetzte Stickstoff bestimmt. Um den Einfluss der verschiedenen Puffer heraus rechnen zu können, wurde die gleiche Futtermenge anstatt mit Enzymlösungen nur mit dem Gemisch der Puffer behandelt. Dabei wurden die Puffer zu einer Lösung zusammengegeben, die dann als Ganzes zugegeben wurde. Damit sollte die abbauende Wirkung der Salzsäure ausgeschlossen werden, da diese durch die Pufferwirkung des Amylasepuffers und vor allem durch das Natriumhydrogencarbonat des Pankreatinpuffers neutralisiert wurde.

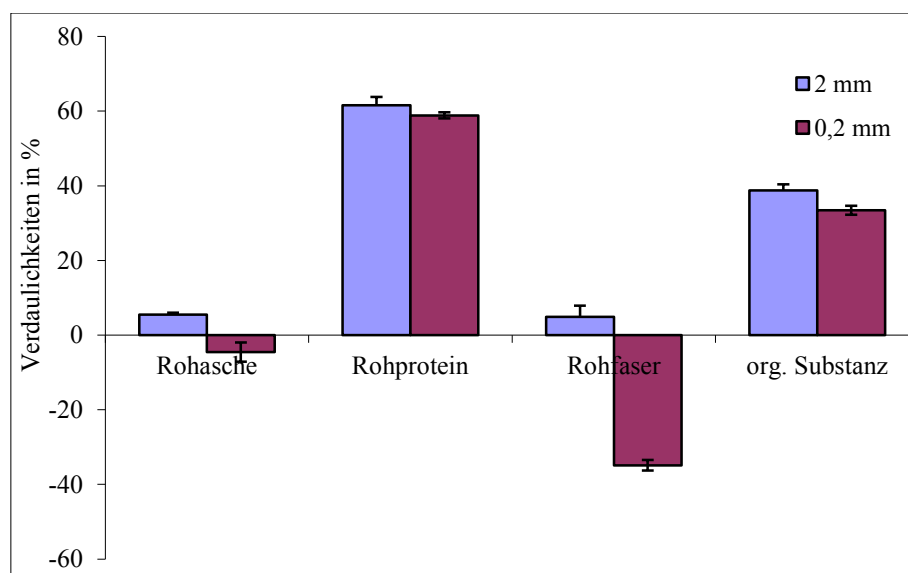


Abb. 23: in vitro Verdaulichkeiten der Fraktionen von Jungsauenaufzuchtfutter mit verschiedenen Korngrößen (0,2 und 2 mm, n=6)

Bei der Bestimmung der Verdaulichkeiten *in vitro* (ivV) wurde auch der Einfluss der Korngröße des eingesetzten Futters untersucht. Bei feiner gemahlenem Futtermittel entstehen größere Oberflächen, die mehr Angriffsfläche für Verdauungsenzyme darstellen. Deshalb könnte die Korngröße einen Einfluss auf den Abbaugrad haben. Als Kontrolle dienten wieder Versuche unter Zugabe des Gemisches der einzelnen Puffer. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Verdaulichkeit festgestellt werden. Auch die Stickstofffreisetzung unterscheidet sich nicht signifikant (Abb. 24).

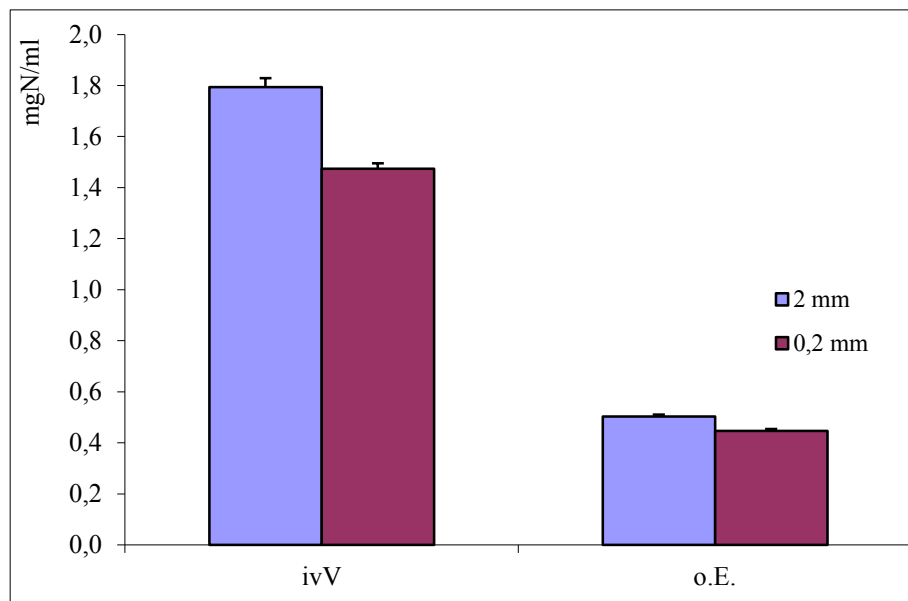


Abb. 24: Stickstofffreisetzung in die flüssige Phase bei der *in vitro* Verdauung (ivV) von Jungsauenaufzuchtfutter (n=6)

5.2.4.2 *In vitro* Abbau von Kartoffeln

Im nächsten Abschnitt wurden die im Fütterungsversuch verwendeten isogenen Kartoffeln der Sorte Albatros untersucht. Im ersten Schritt wurden die Verdaulichkeiten von Rohasche, Rohprotein, Rohfaser und organischer Substanz bestimmt (siehe Abbildung 25).

Im zweiten Schritt erfolgte die *in vitro* Verdauung des im Fütterungsversuch verwendeten Futters. Es bestand aus rohen Kartoffeln und Vormastfutter und wurde in der identischen Zusammensetzung verwendet.

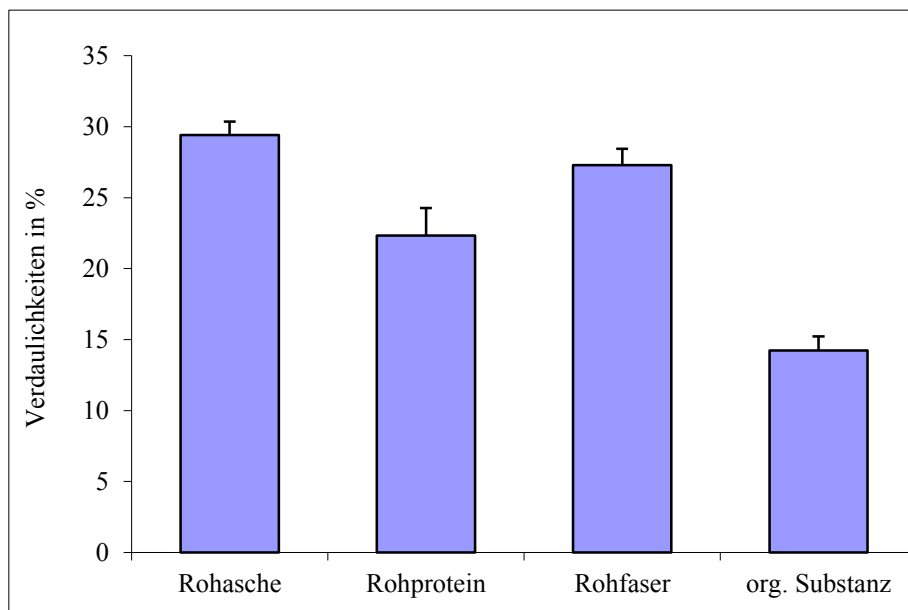


Abb. 25: in vitro Verdaulichkeiten der Fraktionen von Kartoffel Albatros

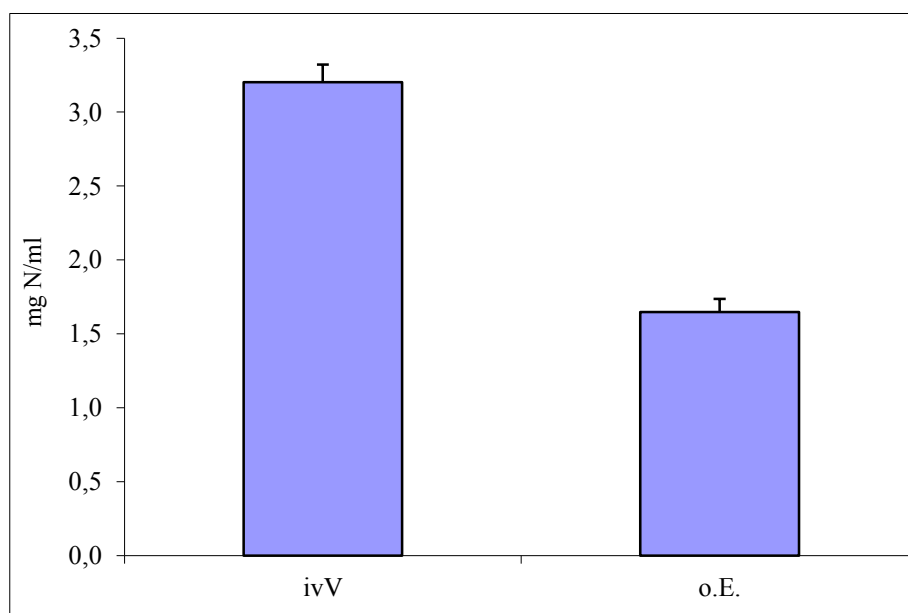


Abb. 26: Stickstofffreisetzung in die flüssige Phase bei ivV von Kartoffel Alba (n=3)

Bei der in vitro Verdauung von rohen Kartoffeln konnten die Verdaulichkeiten in gleicher Weise wie beim Schweinefutter bestimmt werden. Die Fehler waren geringer als bei den in vivo Werten. Der Abbau des Futters während der in vitro Verdauung konnte beschrieben werden. Bei der Stickstofffreisetzung diente der Ansatz ohne Enzyme als Kontrolle. Durch die Enzyme und die Salzsäure wurde signifikant mehr Stickstoff aus den Kartoffeln herausgelöst als ohne Enzyme.

Die geringere Verdaulichkeit der rohen Kartoffeln im Vergleich zu Vormastfutter in vivo, konnte in vitro bestätigt werden.

5.3. Untersuchungen am gentechnisch verändertem Pflanzenmaterial

(Mandy Bruch)

5.3.1. Bestimmung des Flüssigkeitsaufnahmevermögens lyophilisierter Kartoffelknollen und Tabakblätter

Um die Gesamtproteinmenge in Kartoffelknollen und Tabakblättern zu bestimmen und den Einfluss der Aufschlussart zu untersuchen, wurden sowohl die Kartoffelknollen, als auch die Tabakblätter einmal im frischen Zustand und einmal als lyophilisiertes Material hinsichtlich ihres Gesamtproteingehaltes charakterisiert. Der erste notwendige Schritt war die Bestimmung des Flüssigkeitsaufnahmevermögens, um die Stoffmengen- und Konzentrationsverhältnisse von lyophilisiertem Material zum entsprechenden Frischmaterial einordnen zu können. Für die Berechnung wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Linien der Tabak- und Kartoffelpflanzen vernachlässigt.

Tab. 10: Bestimmung der Flüssigkeitsaufnahmen von lyophilisierten Pflanzenmaterial (n = 5)

<i>Pflanzenmaterial</i>	<i>Einwaage</i>	<i>PBS - Zugabe</i>	<i>Überstand</i>	<i>➔ Aufnahme / g</i>
Kartoffelknolle	1 g	5 ml	2 ml	3 ml
Tabakblatt	1 g	20 ml	12 ml	8 ml

Das Aufnahmevermögen von Flüssigkeit pro g lyophilisiertem Pflanzenmaterial ist bei Tabakblättern um fast 200% höher als bei Knollenmaterial. Dieser Versuch diente zur Korrektur von Konzentrationen oder Stoffmengen (diese werden aus den Konzentrationen berechnet) an Inhaltsstoffen, die um die vom Pflanzenmaterial aufgenommene Flüssigkeitsmenge korrigiert wurden.

5.3.2. Freisetzung von Proteinen aus gentechnisch veränderten Pflanzen

Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgte nach Bradford (1976). Beim Abbau des Gesamtproteins wurde nicht zwischen einzelnen Linien unterschieden, da diese sich im Proteingehalt nicht unterschieden, da der Anteil des rekombinanten Proteins am Gesamtprotein sehr gering ist. Deshalb sollten die rekombinanten Proteine keine Auswirkungen auf die Freisetzung und den Abbau von Proteinen aus dem Pflanzenmaterial haben.

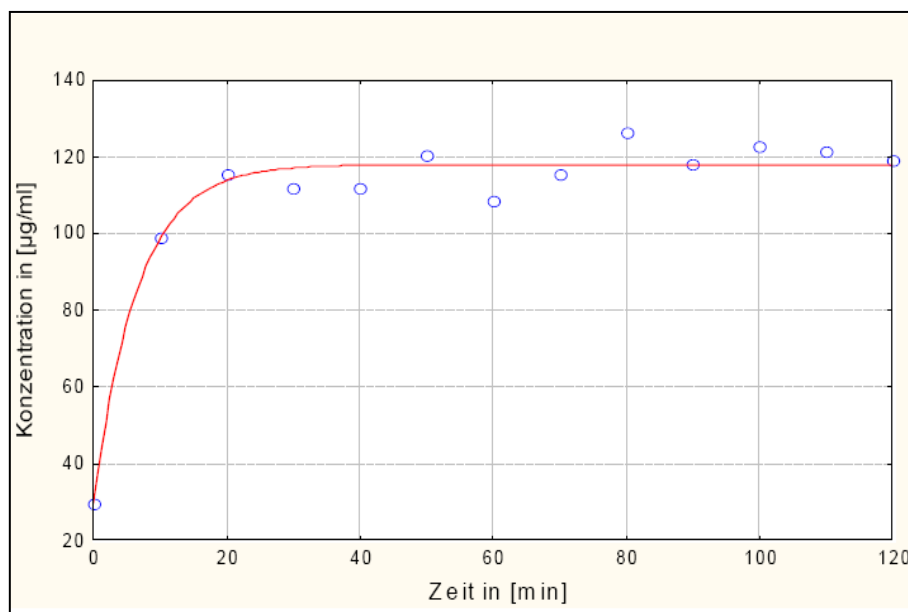


Abb. 27: Modellierung der Freisetzung von Proteinen aus Pflanzen

Die Freisetzung von Proteinen in PBS wurde mittels Bradford bestimmt. Die Konzentration der Proteine kann als Funktion der Zeit beschrieben werden: $c(t) = A + B \cdot e^{(ct)}$. Kenngrößen für die Freisetzung sind die sich einstellende nicht mehr veränderliche Endkonzentration c_{\max} und die Einstellzeit t_{\max} der Endkonzentration. Beide Werte lassen sich aus dem Modell bestimmen. c_{\max} kann in der Gleichung aus A abgelesen werden. t_{\max} wird aus der Gleichung berechnet. Dazu wird sie nach t umgestellt.

$$t_{\max} = \frac{1}{c} \ln \left(\frac{0.95 \cdot A - A}{B} \right)$$

t_{\max} ist die Zeit, bei der die Konzentration 95% von c_{\max} erreicht hat (Konfidenzintervall 5%). Der Aufschlussgrad wird durch die Freisetzung von Proteinen bestimmt. Das Gesamtprotein wurde mittels BRADFORD bestimmt. Die Auswirkungen des Aufschlusses auf Einstellzeit und freigesetzte Proteinmenge wurden untersucht.

Tab. 11: Parameter tmax und cmax bei der Proteinfreisetzung verschieden behandelter Pflanzenteile (n=7)

	T		A	
	lyo	frisch	lyo	frisch
C_{\max}	144,29	197,53	757,45	449,97
S.E.	8,40	16,67	28,12	25,85
t_{\max}	37,80	35,18	21,04	15,85
S.E.	7,49	5,94	1,46	1,74

In der folgenden Tabelle sind die P-Werte der der Daten gegeneinander angegeben.

Tab. 12: P-Werte zu den Daten aus Tab. 11 (T: Tabak, A: Kartoffel Alba, l: lyophilisiert, f: frisch; SIGMA-Plot)

	c (max)	t(s)
T(f) ==> T(l)	0,0180	0,8010
T(f) ==> A(f)	0,0000	0,0160
T(l) ==> A(l)	0,0000	0,3260
A(f) ==> A(l)	0,0000	0,0520
T(f) ==> A(l)	0,0000	0,0480
T(l) ==> A(f)	0,0000	0,4590

Es ist zu sehen, dass die freigesetzte Proteinmenge signifikant von der Art des Aufschlusses abhängt. Des Weiteren unterscheiden sich die freigesetzten Proteinmengen von Kartoffel und Tabak signifikant voneinander. Dabei ist zu beachten, dass es sich um unterschiedliche Organe der beiden Pflanzen handelt. Der Grund könnte in der Art des untersuchten Gewebes liegen. Während beim Tabak die Laubblätter untersucht worden sind, handelte es sich bei den Kartoffelknollen um die Speicherorgane der Pflanzen.

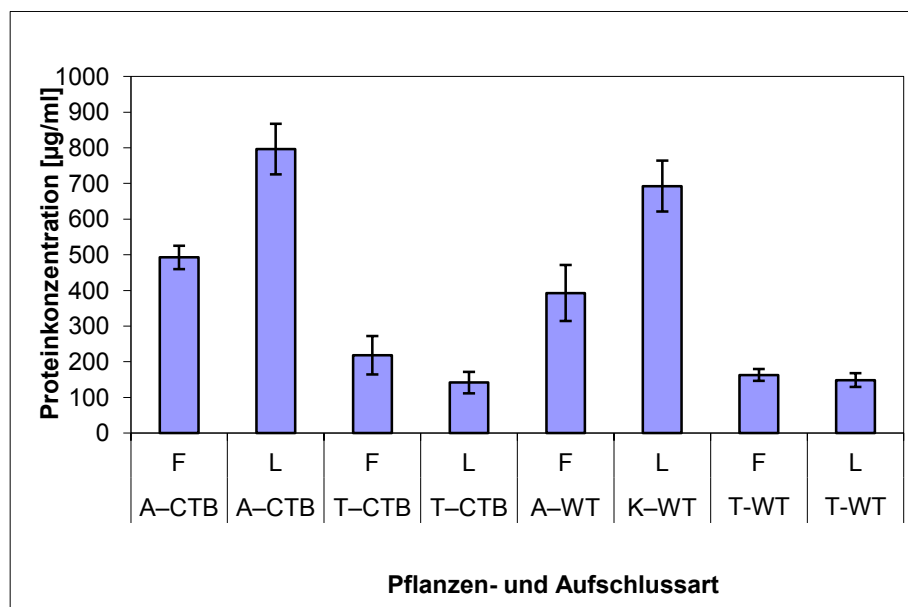


Abb. 28: Konzentration der maximalen Proteinfreisetzungskonzentration (MaxF) in µg/ml bei verschiedenen Pflanzen und Aufschlussarten

(A-CTB = Kartoffel Cholera toxin B), (T-CTB = Tabak Cholera toxin B), (A-WT = Kartoffel Wildtyp), (T-WT = Tabak Wildtyp) L-lyophilisiert, F-frisch ($n \geq 3$, MW = Mittelwert, \pm SD Standardabweichung)

Zur Charakterisierung des Abbauverhaltens von Inhaltsstoffen gentechnisch veränderten Pflanzenmaterials erfolgten im ersten Schritt Untersuchungen zum Proteinabbau. Es sollten mögliche Unterschiede zwischen frischem und gefriergetrocknetem Pflanzen hinsichtlich der enthaltenen Menge an Protein und der Geschwindigkeit des Proteinabbaus untersucht werden. Dazu wurde ein Proteinfreisetzungsversuch (zu untersuchendes Material wurde in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) aufgeschwemmt) durchgeführt. Dabei wurde über eine Zeitdauer von 120 min alle 10 Minuten eine Probe entnommen. Die zu untersuchenden Proben wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt und der Proteingehalt mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Die Proteingehalte wurden sowohl in gehäckseltem Frischmaterial als auch Lyophilisat (jeweils gleiche Charge) von transgenen Kartoffelknollen und Tabakblättern ermittelt. Zusätzlich wurden auch isogene Pflanzen beiden Behandlungsarten unterzogen und analysiert, um eventuelle Unterschiede im Freisetzungsniveau zwischen transgenen und isogenen Pflanzen feststellen zu können. Um Aussagen über den Umfang und den zeitlichen Verlauf der Proteinfreisetzung machen zu können, wurden für alle Messreihen die maximalen Freisetzungskonzentrationen (Max_F) und die Zeitpunkte, an denen 95 % der Max_F erreicht werden, als Kenngrößen berechnet.

Abbildung 28 macht den Unterschied im Gesamtproteinfreisetzungsniveau zwischen Kartoffel- und Tabakmaterial bei gleicher Probemenge (6 g) und gleicher PBS-Zugabe (60 ml), jedoch unterschiedlichen Aufschlussarten deutlich. Die freigesetzte Menge an Protein aus dem Kartoffelmaterial ist bei der Aufschlussart frisch gehäckselt im Schnitt doppelt, bei zusätzlich lyophilisierten Material ca. 3 – 4 mal so hoch wie beim Tabakmaterial.

5.3.3. Abbau von Gesamtprotein durch die Enzyme α -Amylase und Pepsin

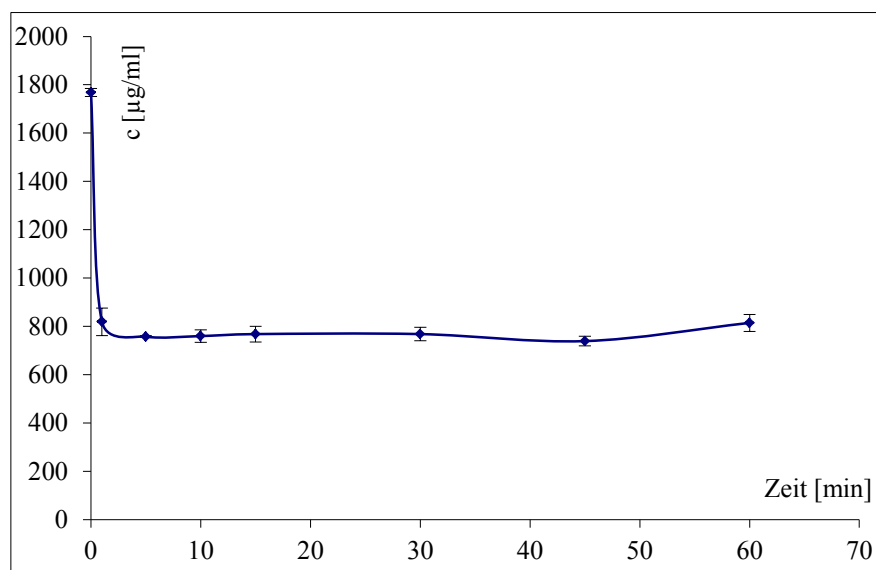


Abb. 29: Abbau des Gesamtproteins durch Pepsin (A-CTB lyophilisiert; n=6)

Um den Verlauf des Proteinabbaus in der Kartoffel näher zu bestimmen, wurde das lyophilisierte Material mit der Pepsin/HCl – Lösung über einen Zeitraum von 60 Minuten inkubiert (Abbildung 29).

Der Anteil an Gesamtprotein in der Kartoffel verringert sich um ca. 50% während der ersten 5 Minuten Pepsineinwirkung. Danach bleibt der Anteil an Protein über den weiteren Verlauf stabil. Das Problem bei dieser Methode ist die Messung der kleinen Proteinfragmente, da sich der Nachweis vor allem auf die aromatischen Aminosäuren bezieht. Allerdings konnte ein direkter Nachweis der Peptidbindung, die durch Pepsin gespalten wird, nicht realisiert werden, da die zugegebene Pepsinlösung die Nachweisreaktionen störte. Mit der Bestimmung des Gesamtproteins konnte vor allem eine Aussage über die notwendige Einwirkzeit von Pepsin auf das Pflanzenmaterial getroffen werden, denn anhand dieser Ergebnisse ist eine Einwirkzeit der Pepsinlösung über 60 Minuten hinaus nicht erforderlich. Die Veränderung des Gesamtproteins zwischen den jeweiligen Sorten der veränderten Pflanzen unterscheidet sich nicht. Auch traten keine Unterschiede zwischen den isogenen und transgenen Pflanzen auf. Das war auch nicht zu erwarten, da die gentechnisch veränderten Proteine nur einen kleinen Anteil am Gesamtprotein haben. Deshalb steht die Darstellung aus Abbildung 29 stellvertretend für das gesamte untersuchte Pflanzenmaterial.

Die Bestimmung der Konzentration an Gesamtprotein erfolgte mit dem Nachweis nach Bradford. Die Konzentration an Gesamtprotein nimmt nach Zugabe von Pepsin sehr schnell ab. Es stellt sich anschließend eine Konzentration ein, die sich während der Pepsininkubation nicht mehr ändert. Diese restliche Proteinkonzentration entspricht den Polypeptiden, welche beim Abbau durch Pepsin entstehen.

5.3.4. Abbau der Modellproteine

5.3.4.1. Unterschiede im Abbau von CTB aus frischem oder lyophilisierten Material

Um nicht nur Unterschiede bei der Freisetzung sondern auch eventuelle Unterschiede beim Abbau der Fremdproteine zwischen frischem und gefriergetrocknetem Material zu untersuchen, wurden sowohl Tabakblätter als auch Kartoffelknollen frisch gehäckselt und der Behandlung mit Pepsin unterzogen. CTB aus frischem Kartoffelmaterial (Ausgangskonzentration ca. 55 ng/ml) ist nach der Inkubation mit Pepsin über einen Zeitraum von 90 min detektierbar und auch danach noch nicht völlig abgebaut (Abbildung 30). Die Gehalte an CTB liegen nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten bei ca. 7 ng/ml. Daher muss bei frischem Kartoffelmaterial von einer verzögerten Freisetzung der Proteine ausgegangen werden.

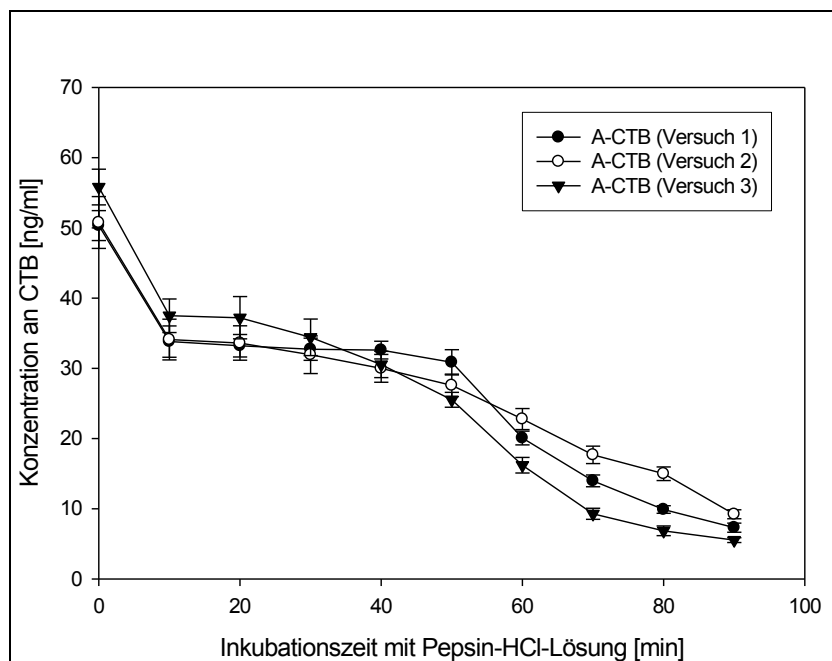


Abb. 30: Zeitlicher Verlauf des CTB-Abbaus (ng/ml) nach Inkubation mit Pepsin – HCl Lösung über 90 Minuten

Bei NPT II war dieser Sachverhalt vergleichbar, auch hier wurde das Protein über einen Zeitraum von 90 min nicht vollständig abgebaut. Dagegen konnte das VP 60 bei gleicher Ausgangskonzentration nach einer Zugabe von Pepsin-HCl-Lösung bereits nach 5 Minuten nicht mehr detektiert werden. Bei der Inkubation von frischem Tabakmaterial ergibt sich folgender Sachverhalt (Abbildung 31).

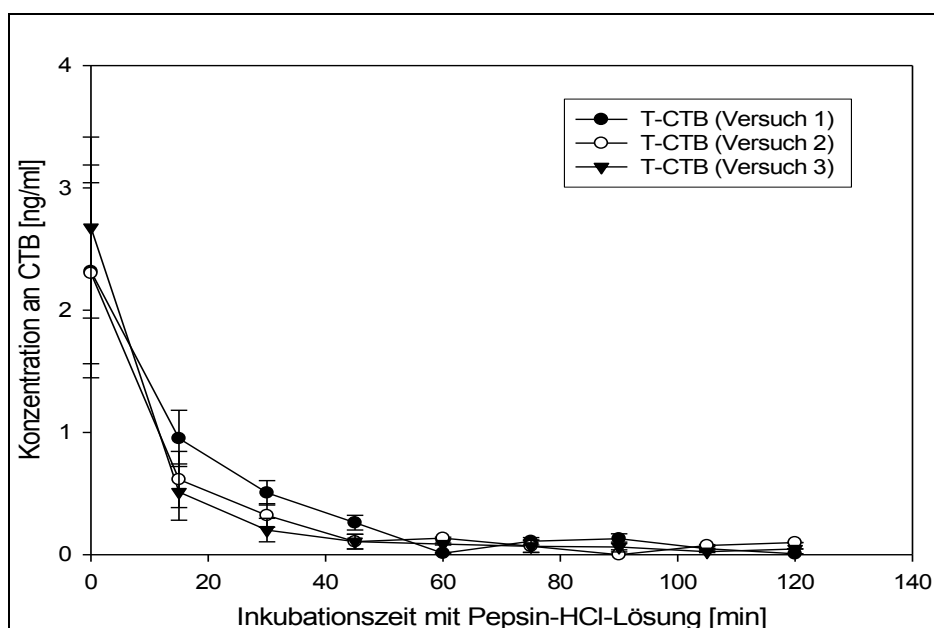


Abb. 31: Zeitlicher Verlauf des CTB- Abbaus (ng/ml) nach Inkubation mit Pepsin-HCl- Lösung über 120 Minuten; n = 6 (T-CTB – Tabak mit Cholera toxin B Untereinheit)

Der Fremdproteingehalt beim Tabakfrischmaterial liegt, im Vergleich zur Kartoffel, auf einem sehr niedrigen Niveau im Bereich von 2,3 bis 2,7 ng/ml. Nach Pepsinzugabe fällt die CTB-Konzentration bei allen Versuchen auf Werte unterhalb von 0,3 ng/ml ab. Die Messreihen weisen über die verbleibende Versuchsdauer, jedoch auf sehr niedrigem Niveau, teilweise schwankende CTB-Konzentrationen auf und fallen zwischen der 60 und 120 Minute des Verdauungsversuchs in den Bereich der Nachweisgrenze

Als weitere Detektionsmethode für die zu untersuchenden Fremdproteine wurde der Western Blot angewendet. Mit dieser Methode sollten die möglicherweise nach Zugabe der Pepsin-HCl – Lösung entstandenen Proteinfractionen nachgewiesen werden. Die Detektion derartiger Fragmente sowohl von CTB, als auch von VP 60 und NPT II war jedoch durch die im Vergleich zum ELISA geringe Sensitivität dieser Methode nicht möglich.

5.3.4.2. Abbau von Modellproteinen durch α -Amylase und Pepsin

Um die gezielte Wirkung von α -Amylase und Pepsin auf die transgenkodierte Proteine nachzuweisen, musste ein Verfahren angewendet werden, das den Abbau der Modellproteine auch anhand von Proteinfragmenten erlaubt. Deshalb wurde der ELISA gewählt, da mittels Antikörper auch eventuelle Bruchstücke detektiert werden konnten (siehe Abbildung 32).

Die Versuche wurden mit $n = 8$ und einer isogenen Pflanze ohne enthaltene Fremdproteine durchgeführt.

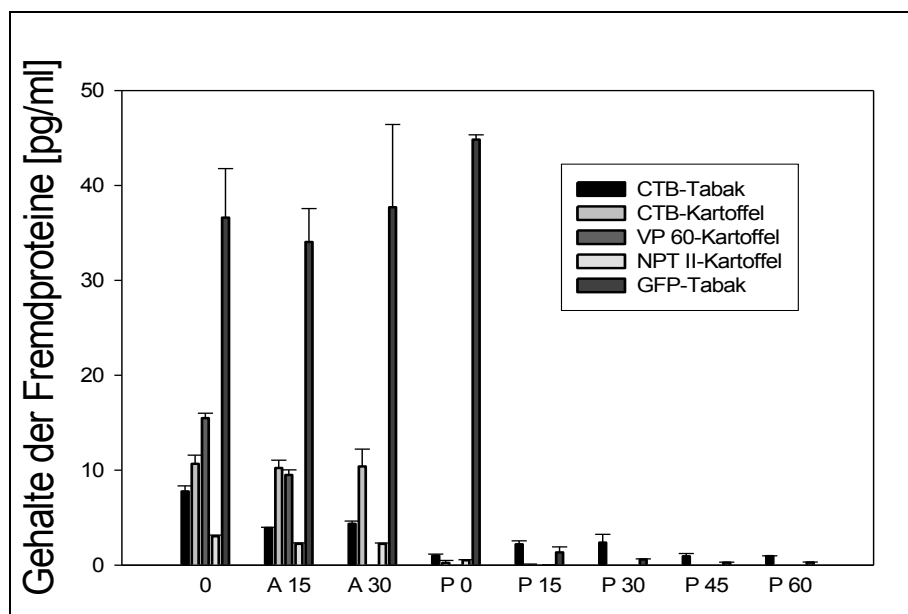


Abb. 32: Bestimmung der Proteine aus lyophilisiertem Pflanzenmaterial nach der Behandlung mit Verdauungsenzymen $n=6$

(CTB: Cholera Toxin B Untereinheit, NPT II: Neomycinphosphotransferase II, VP 60: Viruskapsid 60, 0..60 = Einwirkzeit in min, A = Amylase, P = Pepsin)

In lyophilisiertem Tabak- und Kartoffelmaterial war nach Zugabe von α -Amylase bereits eine Reduzierung der Proteine CTB aus der Kartoffel und VP 60 ebenfalls aus der Kartoffel zu messen. Nach einer Einwirkzeit des Pepsins von 5 min war kein Neomycinphosphotransferase (NPTII) und kein Virales Viruskapsid 60 (VP 60) mehr detektierbar. Nur GFP (Grün flourenzierendes Protein) und CTB (Choleratoxin B Untereinheit) aus Tabak konnten bis zu einer Pepsineinwirkdauer von 60 Minuten nachgewiesen werden.

5.3.4.3 Abbau der Modellproteine während der Lagerung

Bei der Lagerung von frischem Pflanzenmaterial kann es zum Abbau von Proteinen kommen. Vor allem bei instabilen Proteinen, wie zum Beispiel VP60, zeigt sich dieser Effekt. Bei stabilen Proteinen hingegen kommt es zu einer Zunahme der prozentualen Proteinkonzentration. Durch die Lagerung erfolgt eine Abnahme der Bezugsgröße (Frischgewicht). Dies liegt an ablaufenden Stoffwechselprozessen, die auch während der Lagerung stattfinden.

Tab. 13: Veränderungen des Proteingehaltes während der Lagerung von lyophilisierten Pflanzenmaterial

Pflanzen	0-1 Monat	2 Monate	3 Monate	6 Monate
	Proteingehalt pro mg lyo. Material in %			
Desiree/VP60-6	100	80	70	55

5.4 Simulation der Resorption

(Mandy Bruch)

Die Untersuchungen zur Resorption von Proteinen wurden pro Versuchsdurchgang an Darmmaterial von einem Tier durchgeführt. Um aber die tierindividuellen Unterschiede zu erfassen, wurde jeder Versuch dreimal mit jeweils Darmmaterial von einem anderen Tier wiederholt.

5.4.1 Bestimmung des optimalen Darmabschnittes für die Resorption von Proteinen

Um den optimalen Darmabschnitt für die Resorptionsuntersuchungen zu bestimmen, wurde Material von Duodenum, Jejunum und Ileum genommen und der Transport von GFP gemessen.

Tab. 14: Translokation von GFP an unterschiedlichen Darmabschnitten nach 6 Stunden in der Ussing-Kammer

	Duodenum		Jejunum		Ileum	
	Konzentration mukosal (zu Beginn) = 9463.71 ng/5ml, n = 12					
	ng/5ml	%/ Original-substanz	ng/5ml	% Original-substanz	ng/5ml	% Original-substanz
nach 6 h	3.991 ^a	0.045	7.076 ^b	0.073	6.051 ^b	0.075
S.E.	0.573	0.005	1.341	0.007	1.055	0.014

^{a, b} verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den markierten Werten

Dazu wurden der Inhalt (5 ml) der serosalen Kammerhälfte der USSING-Kammer durch vollständige Lyophilisation aufkonzentriert und anschließend mittels ELISA vermessen. Dies war nötig, da die Konzentrationen ansonsten unterhalb der Nachweisgrenze gelegen hätten. Die Darmabschnitte Jejunum und Ileum weisen einen signifikant höheren Transport von GFP im Gegensatz zum Duodenum auf. Für weitere Untersuchungen an der Ussing-Kammer wurde daher immer Material aus dem Ileum verwendet.

5.4.2 Bestimmung des [³H]-Mannitoltransportes

Diese Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit eine Präparation des entnommen Darmgewebes sinnvoll ist. Je dicker das Gewebe, desto geringer ist die Diffusion von Mannitol. Die Diffusion ist am größten, wenn Mucosa und Muscularis entfernt werden. Das entspricht einem Transport vom Darminnenraum in das Blut. Der Transport am ungestrippten Darm würde den Transport vom Darm in die Bauchhöhle simulieren. Deshalb wurden die Versuche mit vollständig gestripptem Darm (d.h. Mucosa und Muscularis wurden entfernt) durchgeführt.

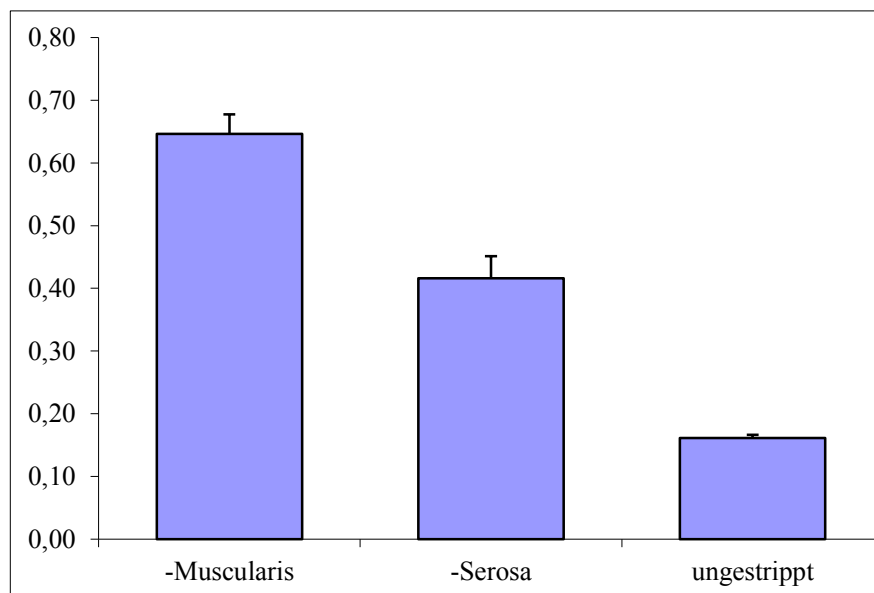


Abb. 33: Diffusion von ^3H -Mannitol an verschiedenen „gestrippten“ Schweine-Ileum

Diese Abbildung zeigt eine signifikant höhere Diffusion von [^3H]-Mannitol am komplett „gestrippten“ Ileum.

5.4.3 Resorption der Modellproteine

(Mandy Bruch)

Die Resorption der Modellproteine ist an vier Tieren je fünfmal untersucht worden. Wie in Tabelle 15 zu sehen ist, konnte dabei bei zwei Proteinen ein Transport festgestellt werden.

Dabei ist zwar der Transport von GFP absolut gesehen größer als der von VP60, aber auch die Donorkonzentration lag 125-fach höher als beim GFP, prozentual sind bei VP60 0,75 % und bei GFP 0,16 % transportiert worden.

Tab. 15: Resorption der Modellproteine in der Ussing-Kammer (n = 20)

	GFP [ng/ml]	NPT II [ng/ml]	VP60 [ng/ml]	CTB [ng/ml]
mucosal t=0h	3073,50 ± 707,65	2,67 ± 0,19	23,88 ± 1,77	20,46 ± 5,69
mucosal t=6h	3349,15 ± 1109,56	2,03 ± 0,55	17,83 ± 3,14	17,34 ± 6,25
serosal t = 6h	5,02 ± 2,4	n. d.	0,18 ± 0,1	n. d.

^{a, b} verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den markierten Werten

5.4.4. Spezifizierung des GFP Transportes

5.4.4.1. In vitro Transport von GFP mit Cholchicin und Cytochalasin D

Der Einfluss von Cholchicin und Cytochalasin D auf die Diffusionseigenschaften des Epithels wurde mit Hilfe von [^3H]-Mannitol bestimmt. Es sollten Einflüsse der beiden Inhibitoren des Cytoskeletts auf die Diffusionseigenschaften des Epithels ausgeschlossen werden. Wie in Tabelle 16 zu erkennen ist, haben Cholchicin und Cytochalasin D keinen Einfluss auf die Diffusionseigenschaften des Gewebes (keine Beeinflussung des Mannitoltransportes).

Tab. 16: Transport von GFP und [^3H]-Mannitol am porcinen Ileum (in % pro cm^2 und Stunde)

	GFP			^3H -Mannitol		
	Kontrolle	Cytochalasin D	Colchicin	Kontrolle	Cytochalasin D	Colchicin
MW	0,133 ^b	0,018 ^c	0,005 ^d	0,559 ^b	0,616 ^c	0,509 ^a
S.E.	0,020	0,010	0,002	0,190	0,270	0,160
n	18	8	11	18	8	12

^{a, b} verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den markierten Werten

Deshalb kann davon ausgegangen werden, der teilweise gehemmte Transport von GFP durch Colchicin und Cytochalasin D nicht durch veränderte Diffusionseigenschaften des Gewebes zurückzuführen ist. Damit könnten die gemessenen Werte auf einen aktiven Transport von GFP hindeuten.

Bei den Untersuchungen zum GFP-Transport wurde zunächst nicht auf eine Trennung der isolierten Epithelstücken in Payersche Platten und Nicht-Payersche Platten geachtet. Bei den weiteren Untersuchungen zum GFP-Transport folgte eine Trennung der Epithelstücke in Epithel mit Payerschen Platten (PP) und Epithel ohne Payersche Platten (ohne PP). In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss der Temperatur und des Vorhandenseins von Payerschen Platten bestimmt werden.

Tab. 17: Transport von GFP am porcinen terminalem Ileum unter verschiedenen Bedingungen (n = 12)

	24°C				37°C			
	GFP		GFP+COL		GFP		GFP+COL	
	ohne PP	PP	ohne PP	PP	ohne PP	PP	ohne PP	PP
MW	7,05 ^a	3,8 ^b	6,07 ^a	3,28 ^b	5,21	2,97	4,90	2,70
S.E.	1,16	0,72	1,10	0,71	0,92	0,64	0,90	0,54

^{a, b} verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den markierten Werten

Es sind signifikante Unterschiede im Transport von GFP an den payerschen Platten im Gegensatz zum Gewebe ohne payersche Platten zu sehen. Des Weiteren scheint eine höhere Temperatur die Resorption negativ zu beeinflussen. Dagegen scheint die Zugabe von Cholechicin keinen Einfluss auf Aufnahme von GFP am Darm zu haben, wenn bei der Untersuchung eine Einteilung des Gewebes in Gewebestücke mit payerschen Platten und Gewebestücke ohne payersche Platten erfolgt.

5.4.4.2 *In vitro* Transport von GFP mit Hemmung der ABC Transporter

Da die bisherigen Untersuchungen eher Zweifel an einer aktiven, das Cytoskelett involvierenden Aufnahme von GFP erbracht haben, sollte nun ein eventueller Transport über die ABC-Transporter untersucht werden.

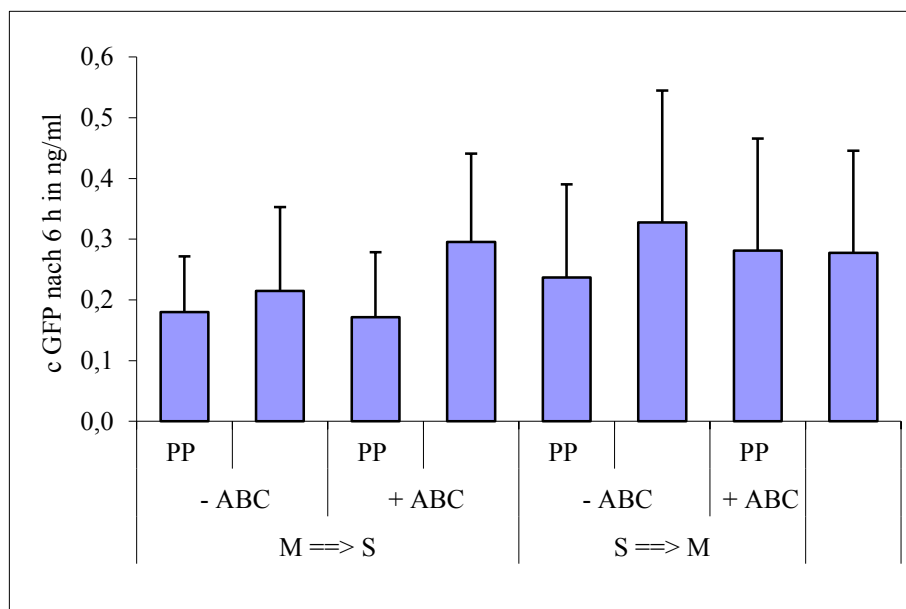


Abb.34: Hemmung des Transportes von GFP durch Glibenglamid

(PP: Peyersche Platten, ABC-ABC-Transporter, M-mukosal, S-serosal),

Es ist eine signifikante Hemmung des Transportes in beide Richtungen durch Glibenglamid zu erkennen. Weiterhin ist der schon aus vorhergehenden Experimenten (Tabelle 17) bekannte Unterschied zwischen Epithel mit und ohne Payersche Platten zu erkennen.

5.4.5 Einfluss von CTB auf den VP60 Transport

Der Einfluss des CTBs auf die Resorption von VP60 wurde am Epithel von Schweinen untersucht, da CTB als „Türöffner“ für VP60 dienen soll. Der Grund sind die Eigenschaften als Hüllprotein des Choleraviruses, da es das Anheften an das Epithel ermöglicht, um das eigentliche Choleravirus in den Organismus einzuschleusen. Es konnte kein signifikanter Effekt des

CTBs auf die Resorption von VP60 festgestellt werden. In Abbildung 35 ist zu sehen, dass die Resorption des Fusionsproteins gegenüber der Aufnahme von VP60 erhöht ist, der Effekt ist aber nicht signifikant ($P=0,629$).

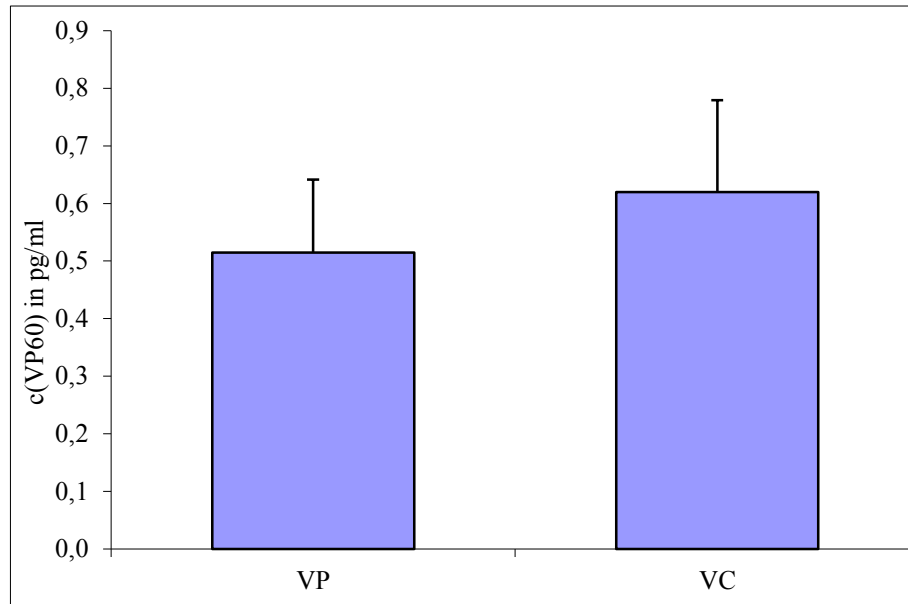


Abb. 35: Transport von VP60 (VP) und VP60-CTB Fusionsprotein (n=15) am terminalem Ileum

5.5. Histologie / Immunohistochemie

(Mandy Bruch)

5.5.1 Beschaffenheit des Darmes zum Versuchsende (Ussing-Kammer-Versuche)

Um die Auswirkungen der Inkubation mit Puffer / Proteinlösung über 6 h bei 37°C auf das Darmepithel zu untersuchen, wurden die verwendeten Darmstücke nach dem Versuch für histologische Untersuchungen aufbereitet.

Hierzu wurden die verwendeten Gewebestücke terminalen Ileums, ohne Muskelschicht, im zeitlichen Abstand von 20 min, 40 min, 1h, 2h, 3h und 4h aus der Ussing-Kammer entfernt und histologisch untersucht. Als Kontrolle diente ein frisches, nicht inkubiertes Stück des terminalen Ileums ohne Muscularis.

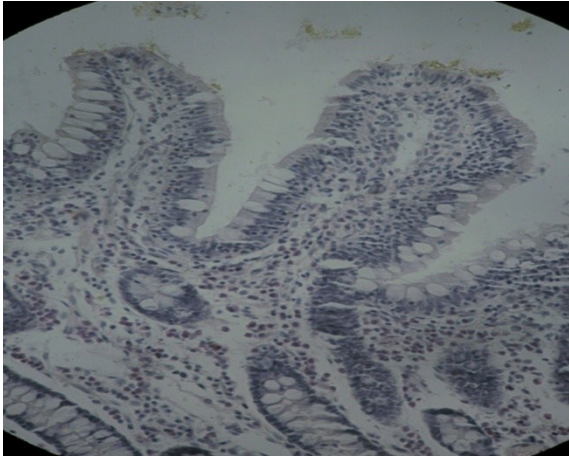


Abb. 36: Terminales Schweineileum, ohne Muscularis, Kontrolle ohne Inkubation in der Ussing-Kammer

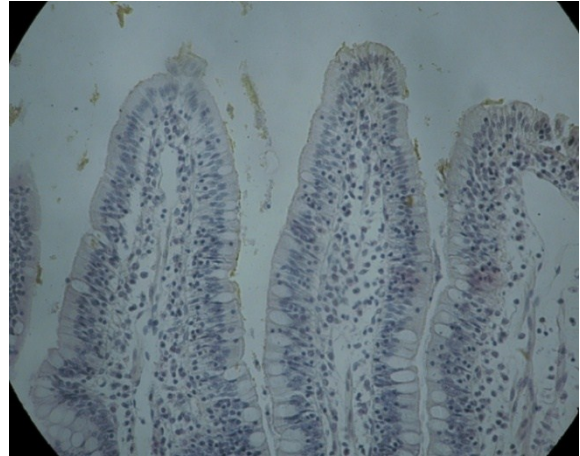


Abb. 37: Terminales Schweineileum ohne Muscularis, nach 40 min in der Ussing-Kammer

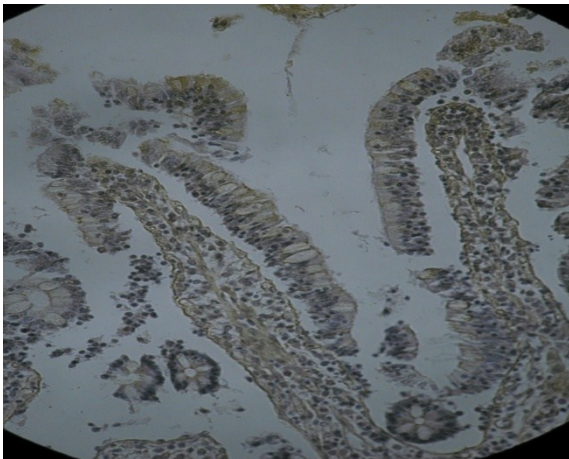


Abb. 38: Terminales Ileum vom Schwein ohne Muscularis nach 6 h in der Ussing-Kammer

Die Abbildung 36 zeigt ein intaktes Epithel und im Vergleich dazu ist in Abbildung 37 die sich beginnende Ablösung der äußeren Epithelschicht zu sehen. Im weiteren Verlauf der Inkubation wird das Epithel immer löchriger. Nach 6 h Inkubation in der Ussing-Kammer sind schließlich kaum noch feste Gewebestrukturen erkennbar (Abb. 38).

5.5.2. Detektion von GFP im Darmepithel

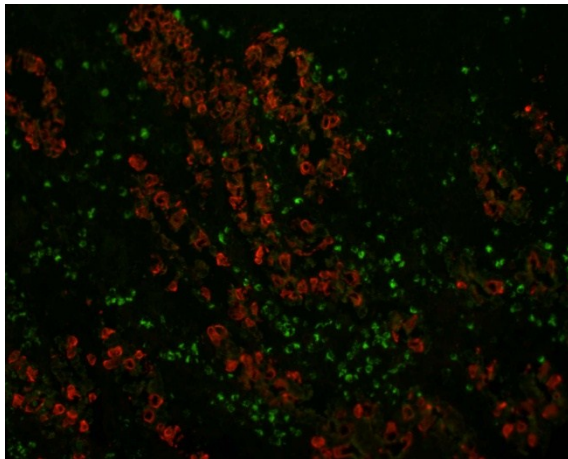


Abb. 39: Terminales Ileum vom Schwein, nach 6 h Inkubation mit GFP, Detektion von GFP in grün, Becherzellen rot



Abb. 40: Terminales Ileum vom Schwein, nach 6 h Inkubation mit GFP, Durchlichtaufnahme

Mit immunohistologischen Verfahren galt es zu untersuchen, ob eine Detektion von GFP während bzw. nach dem Übertritt durch das Darmepithel auf die serosale Seite der Ussing-Kammer möglich ist. Damit sollte vor allem der Transportweg von GFP durch das Darmepithel bzw. die am Transport beteiligten Zellstrukturen sichtbar gemacht werden. Die im Darm enthaltenen M-Zellen wurden mit einem speziellen CK 18 Antikörper angefärbt und das GFP mit einem weiteren spezifischen Antikörper. In der Abbildung 39 sind die M-Zellen rot dargestellt und das GFP grün.

In der Abbildung 39 ist zu sehen, dass sich das GFP gleichmäßig im Darmgewebe verteilt und nicht intrazellulär von M-Zelle zu M-Zelle transportiert wird. Eher lassen diese Aufnahmen einen parazellulären Transport zwischen den Zellen hindurch vermuten.

5.6 Tierversuch

(Andre Kacholdt)

5.6.1 Zootechnische Parameter der Tiere

5.6.1.1 Lebendmassezunahme der Tiere

Die Lebendmassezunahme wurde über den Zeitraum des Tierversuches erfasst. Die Tiere wurden bei der Einstellung nüchtern und bei Versuchsende nach der Fütterung gewogen.

In Tabelle 18 sind die Lebendmassezunahmen der Tiere im Fütterungsversuch dargestellt. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in den Werten zwischen den beiden Gruppen.

Tab. 18: Lebendmassezunahmen während der Fütterung mit isogenen und transgenen Kartoffeln

	absolut in g		in %	
	isogen	transgen	isogen	transgen
MW	556,75	612,10	77,71	76,83
S.E.	89,81	16,67	3,99	2,88

5.6.1.2 Blutwerte der Tiere

Die entnommen Blutproben wurden auf, durch die Verfütterung von gentechnisch veränderten Pflanzen verursachte, Veränderungen untersucht. Dabei wurde jeden Tag aus Vollblut ein kleines Blutbild erstellt. Das Serum vom Tag 0 und vom letzten Tag wurde in einem großen Screening nochmals genauer untersucht. Die Verfütterung von rohen Kartoffeln (isogen) begann schon eine Woche vor der ersten Blutentnahme. Die vollständigen Werte befinden sich im Anhang.

Tab. 19: Änderungen des kleinen Blutbildes durch die Verfütterung von rohen Kartoffeln

	Tag0	Tag1	Tag2	Tag3	Tag4	Tag5	Tag9	S.E.	von	bis
Erythroz. [$10^{12}/l$]	7,4	7,0	7,4	6,9	6,7	6,5	6,2	0,2	5,8	8,1
Hämatokrit [l/l]	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,0	0,3	0,5
Hämoglobin [g/l]	126,8	121,1	127,0	119,2	116,0	113,3	108,7	2,7	108,0	148,0
Leukoz. [$10^9/l$]	20,9	25,6	19,2	21,8	21,4	22,5	16,4	1,2	10,0	22,0
-segmentkernige [$10^9/l$]	7,5	13,9	6,9	8,0	8,1	8,7	6,0	0,6	1,0	8,2
Lymozyten [$10^9/l$]	11,6	10,0	10,4	11,6	11,3	11,5	9,3	0,6	6,0	16,0
Monozyten [$10^9/l$]	0,8	1,0	0,9	1,0	1,1	1,3	0,6	0,1	0,0	1,0
-basophile [$10^9/l$]	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7	0,3	0,0	0,0	1,3
-eosinophile [$10^9/l$]	0,3	0,1	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,0	0,0	0,1
stabkernige [$10^9/l$]	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	1,5
Thrombocyten [$10^9/l$]	167,8	144,2	277,7	318,1	371,7	234,4	291,4	32,1	175,0	580,0

Da sich zwischen den Gruppen (Verfütterung von isogenen und transgenen Kartoffeln) die Blutwerte des kleinen Blutbildes nicht signifikant voneinander unterscheiden, werden in Tabelle 18 die Mittelwerte von allen 18 Tieren dargestellt. Die sich nicht im Normbereich befindlichen Werte sind rot eingefärbt.

Die Blutwerte der Tiere liegen bis auf wenige Ausnahmen, z.B. die eosinophilen Lymphozyten im Normbereich. Der Effekt bei den eosinophilen Lymphozyten ist aber, falls überhaupt

durch den Versuch verursacht, nicht auf die in den Kartoffeln enthaltenen veränderten Proteine zurück zuführen, da die erhöhten Werte schon vor Beginn der Fütterung mit veränderten Kartoffeln auftraten. Die Ursache könnte in der Verfütterung von rohen Kartoffeln liegen.

Im Serum vom Tag 0 und vom Ende des Versuches wurden die Konzentrationen von verschiedenen Ionen und Proteinen gemessen (großes Screening). Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde mit einem gepaarten T-Test untersucht, um die tierindividuellen Unterschiede zu berücksichtigen.

Tab. 20: Veränderungen im großen Screening vor und nach dem Versuch:

	vor Versuch			nach Versuch		
	A-WT	A-N2	A-CY	A-WT	A-N2	A-CY
a-Amylase	1987,7	2068,0	2160,8	1763,5	1753,8	2083,8
Lipase	10,7	8,8	8,5	6,8	9,7	7,9
AP	85,5	90,2	96,2	68,2	79,3	98,8
Bilirubin	1,2	1,1	1,1	1,0	1,2	1,8
Ca	3,0	2,9	2,9	2,7	2,7	2,8
CK	290,7	402,4	549,3	446,7	733,9	575,4
Cholesterin	2,6	2,6	2,3	2,1	2,3	2,3
Gesamtprotein	67,6	64,6	63,2	55,6	56,7	59,4
Albumin	42,9	41,6	40,2	34,9	35,3	37,3
Mg	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9
Phosphat	3,2	3,1	3,2	2,6	2,6	3,0
Fructosamine	245,0	227,4	230,2	210,3	214,2	228,8
GLDH	1,4	1,4	2,1	1,4	2,3	1,9
ALT(GTP)	34,8	32,6	30,7	25,3	27,9	29,1
AST(GOT)	18,6	17,0	15,0	18,3	20,8	18,8
Harnstoff	3,0	3,4	2,7	2,7	3,0	3,0
Kreatinin	91,5	98,3	94,8	97,9	96,6	97,9
K	6,2	6,3	5,9	10,5	10,4	10,4
Na	146,5	142,5	143,3	133,0	132,7	137,3
Fe	20,6	22,8	16,6	18,3	20,9	26,0

Es gab in vielen Fällen signifikante Unterschiede ($P < 0,05$). Die meisten Signifikanzen (11 von 20 Werten) traten beim Wildtyp auf. Nur wenn Unterschiede bei der transgenen Verfütte-

rung und nicht bei der isogenen Verfütterung auftreten, kann man von einem Einfluss des exprimierten Antigens sprechen. Das ist nur beim Eisengehalt (Fe) der Fall.

Andererseits gibt es Fälle, in denen die Verfütterung isogener Kartoffeln zu einer signifikanten Veränderung führt, welche aber durch die Verfütterung von transgenen Kartoffeln nicht hervorgerufen wird (z.B. AP, Ca).

5.6.2. NPTII Vorkommen

5.6.2.1. NPTII im Verdauungstrakt

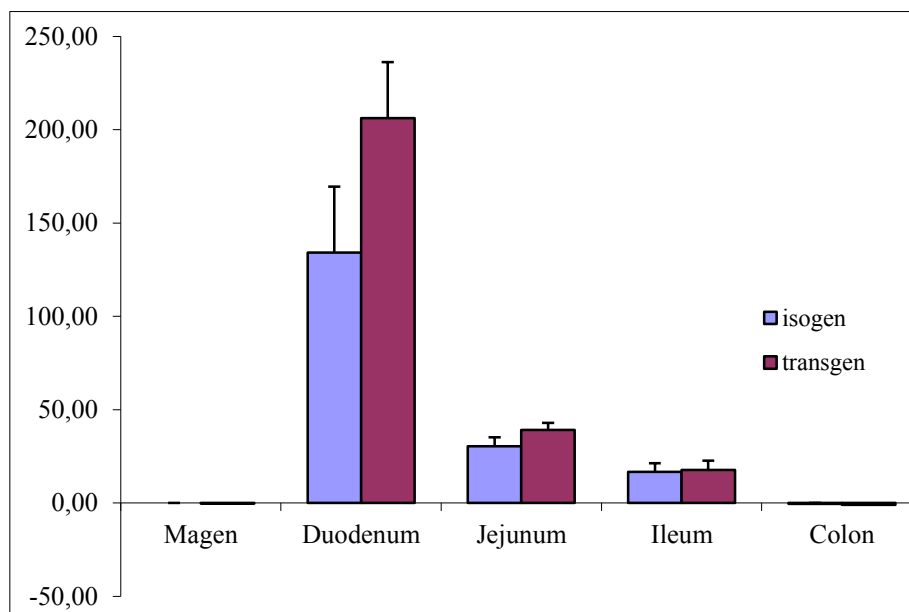


Abb. 41: Gehalt von NPTII im Zentrifugat von Chymus auf Gesamtprotein bezogen

In den flüssigen Phasen des Chymus aus den verschiedenen Abschnitten des Darmes konnte NPTII nachgewiesen werden. Dagegen fand sich im Zentrifugat des Magen chymus kein NPTII.

Im Duodenum der mit transgenen Kartoffeln gefütterten Tieren kann signifikant ($P=0,038$) mehr NPTII nachgewiesen werden als bei den Tieren, deren Futter aus isogenen Kartoffeln bestand. Mit zunehmendem Abbau werden die Konzentrationen und die Unterschiede geringer. Im Jejunum ist kein signifikanter Unterschied zwischen isogener und transgener Fütterung mehr festzustellen.

5.6.4.2. Lösen von NPTII aus Magen chymus

Die Ergebnisse der Freisetzung von intakten Proteinen erst im Jejunum sprechen für eine Schutzfunktion der Zellen für die Proteine, die dadurch die Magenpassage unbeschadet über-

stehen. Wenn dies der Fall ist, so müsste sich in dem aus dem Magen entnommenen Feststoff intaktes Protein nachweisen lassen.

In den Experimenten konnte aus allen Pellets der Zentrifugation des Mageninhaltes NPTII nachgewiesen werden. Der Feststoff wurde hierzu zusätzlich feiner vermahlen, da sich das noch intakte NPTII innerhalb der Futtermittelpartikel befindet. Alle NPTII Moleküle, die sich an den Rändern der Futtermittelstücke befanden wurden bereits durch Pepsin und Salzsäure abgebaut. Dieser Umstand konnte bei allen Tieren des Tierversuches nachgewiesen werden.

5.6.2.3. Vorkommen von NPTII im Blut

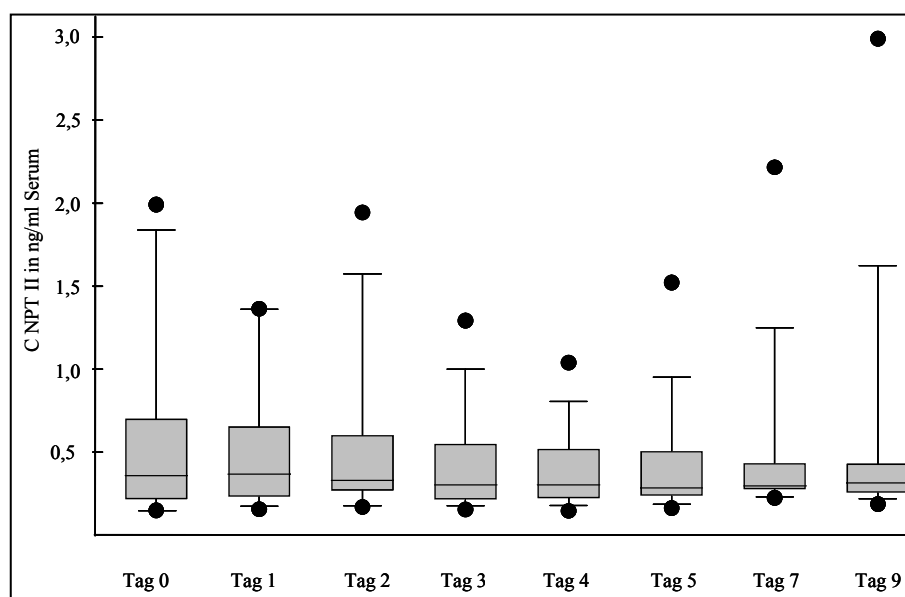


Abb. 42: Box-Plot der NPTII Konzentration (C NPT II) im Serum während des Fütterungsversuches (n=12)

Die Abbildung zeigt das Vorkommen von NPT II im Blut der insgesamt 18 Tiere. Die Tiere 1 bis 6 wurden mit isogenen Kartoffeln gefüttert, die Individuen 7 bis 12 mit Kartoffeln der Linie A-N2 und die Schweine 13 bis 18 mit A-CY. Das NPT II war an allen Tagen im Blut der Tiere nachzuweisen, schwankte aber über den gesamten Versuchszeitraum. Die Konzentrationen von ca. 0,1 ng/ml Serum weisen auf sehr geringe NPT II Gehalte hin. Dieser untere Punkt der Werteverteilung ändert sich über den Zeitraum von 9 Tagen nicht und begründet die isogene Fütterung der Gruppe I. Die Streuungen über die Fütterungsperiode hinweg, bzw. der vergleichsweise geringe Wert für die NPT II Konzentration im Serum an Tag 4 lassen sich nicht begründen, denn die Futteraufnahme war nicht geringer als an den anderen Tagen. Die gemessenen Werte zeigen große Schwankungen, die auf tierindividuelle Unterschiede schließen lassen. Ab Tag 5 steigt die NPT II Konzentration im Serum bis Tag 9 kontinuierlich an und könnte auf eine Anreicherung von NPT II aufgrund der mehrere Tage andauernden Füt-

terung mit gentechnisch veränderten Kartoffeln beruhen. Das bedeutet, das Protein ist nicht im Verdauungstrakt gespalten oder wieder ausgeschieden worden, sondern es konnte zumindest teilweise resorbiert werden. Aber aufgrund anderer widersprechender Ergebnisse und der geringen Wiederholungszahl im Versuch ist hier nur von tendenziellen Ergebnissen auszugehen.

6 Diskussion

6.1 Untersuchung der Verdauung in vitro

(Andre Kacholdt)

6.1.1 Voruntersuchungen

6.1.1.1 Entwicklung von Messmethoden

Die zu entwickelnde in vitro Verdauungsmethode sollte sich eng an der natürlichen Verdauung eines Monogasters orientieren. Gleichzeitig sollte ebenfalls geprüft werden bis zu welchem Grad Futtermittel in vitro abgebaut werden können. Aus diesem Grund ist die Auswahl einer Größe notwendig, die es erlaubt, den Abbaugrad der Futtermittel zu messen, indem eine Möglichkeit gefunden wird, die abgebauten Stoffe von den nicht abgebauten zu trennen. Bei den Ausgangsstoffen handelt es sich vorwiegend um Biopolymere (Proteine, Stärke, Fette). Durch die Einwirkung der Enzyme werden diese zu den entsprechenden niedermolekulareren Verbindungen abgebaut. Die Enzyme können nur an den Stellen wirken, die sie auch erreichen können: die Oberflächen der Futtermittel. Die dort abgebauten Substanzen sind in der Lage, sich im umgebenden Medium (wässriger Puffer) zu lösen.

Der Zweck der Verdauung ist die Umwandlung der Nahrung von großen Bissen in resorbierbare Verbindungen, bzw. das Herauslösen dieser aus der Nahrung. Dafür müssen diese Verbindungen niedermolekular sein, da hauptsächlich niedermolekulare Mono-, Di- und Trimere in die Zellen transportiert werden. Die Monomere von Zuckern und Aminosäuren sind in wässrigen Medien löslich. Zur Trennung von unlöslichen Substanzen gibt es zwei Methoden: Dialyse und Zentrifugation. Beide werden in in vitro Modellen eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.2). Bei einer Dialyse können aber nicht alle in Lösung gegangenen Stoffe vollständig abgetrennt werden. Die Dialyse ist auch sehr zeitaufwendig, da ein Durchgang oft nicht ausreichend ist. Deshalb erfolgte im vorgestellten Modell die Abtrennung der abgebauten Stoffe mittels Zentrifugation. Nachteil ist hierbei, dass auch Stoffe abgetrennt werden, die sich zwar im wässrigen Medium lösen, aber in vivo nicht resorbiert werden.

Da die Ablösung von den Nahrungspartikeln und der Übergang in das wässrige Milieu die Grundvoraussetzung für potentielle Resorption ist, wurde als Maß für den Grad der Verdauung der Masseverlust eingeführt. Dabei handelt es sich um die Masse, die beim Verdauungsprozess abgebaut wird und in Lösung geht, und dem übrig bleibenden, festen Rest. Die Messung erfolgt gravimetrisch. Um die Ergebnisse nicht durch Restfeuchte zu verfälschen, ist es nötig die Ausgangssubstrate (Futtermittel, Lyophilisate von gentechnisch veränderten Pflan-

zen) und die Reststoffe bei jeweils 105°C zu trocknen, und anschließend im Exsikkator abkühlen zu lassen.. Dabei orientierte man sich an der Bestimmung der Rohfaser im FOSS-FIBERTEC Heiss-Extraktor, die in Fritten mit genormter Porengröße (G 3) erfolgt.

6.1.1.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten in vivo

Die in der Literatur beschriebenen Enzymaktivitäten weichen sehr stark voneinander ab (siehe Tab. 2) und sind deshalb als Quelle nicht brauchbar. Deshalb sollte sich die in dieser Arbeit zu entwickelnde Methode an dem Vorbild, dem Verdauungstrakt des Monogasters (Schwein) orientieren. Da keine ausreichenden in vivo Daten zu den Enzymaktivitäten gefunden wurden, mussten die Aktivitäten der Verdauungsenzyme bestimmt werden.

Aus den Werten in Tabelle 8 ist zu erkennen, dass sich die Aktivität der Speichelamylase pro Milliliter Speichel zwischen Mensch und Schwein signifikant unterscheiden.

6.1.1.3 Bestimmung eines geeigneten internen Markers

Der Abbau im Tier kann aufgrund der Sekretion endogener Substanzen nicht durch die Bestimmung einer Masseabnahme oder den Nachweis der Abbauprodukte erfasst werden, da nicht unterschieden werden kann, ob die Abbauprodukte endogenen oder exogenen Ursprungs sind. Durch die endogene Sekretion und die schon beginnende Resorption ist es unmöglich, den Abbaugrad durch eine direkte Messung der Massedifferenz von entnommenen Proben zu ermitteln. Es gibt keine direkte Beziehung zwischen einer Ausgangsfuttermittelmenge und der daraus resultierenden Menge an Chymus. Durch die Verwendung eines Markers kann ein Zusammenhang zwischen dem Ausgangsfutter und dem Chymus hergestellt werden. Dieser Marker muss verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Er muss inert gegen die Reaktionen des Verdauungstraktes als auch gegen die Reaktionen der Analytik sein. Ist dies der Fall, so kann aus dem prozentualen Anteil des Markers im Chymus der Abbaugrad bestimmt werden. Dazu ist die Bestimmung des prozentualen Anteils des Markers im Ausgangsfutter notwendig. Bedingt durch die Inertheit des Markers bleibt dessen absolute Masse konstant, während es zum Abbau und zur Resorption der Gesamtmasse kommt. Durch die Verringerung der Bezugsmasse steigt die masseprozentuale Konzentration des unveränderbaren Markers im Chymus mit zunehmenden Abbau und zunehmender Resorption an.

Es gibt verschiedene Marker - interne und externe. Externe Marker müssen vor Beginn der Fütterung ins Futter gemischt werden. Beispiele für externe Marker sind TiO_2 oder verschiedene Chromate (Jagger *et al.* 1992). Die Wiederfindungsrate der Chromate ist bei Cr_2O_3 am schlechtesten. Für spätere Analysen ist eine sehr gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten. Dem Problem der möglichst homogenen Verteilung kann durch die Verwendung eines

internen Markers, wie zum Beispiel die in 4 M HCl unlösliche Asche, begegnet werden. Ein weiterer Grund, einen internen Marker zu verwenden, dessen Eignung beim Schwein von Jagger (1992) bestätigt wird, ist die einfache Anwendung (kein Einmischen eines externen Markers nötig). Die Eignung wurde in eigenen Untersuchungen nochmals bestätigt (Tabelle 20). Die Bestandteile der endogenen Sekretion werden nicht berücksichtigt. Da es sich hierbei hauptsächlich um Enzyme und leichtlösliche Salze handelt, kann deren Anteil an in HCl unlöslicher Asche als vernachlässigbar gering angesehen werden.

Tab. 20: Berechnungen zur SURA-Bestimmung in vitro

SURA	Rückwaage	m_{vor}/m_{nach}	SURA_{FM} (theoretisch)	SURA_{FM} (experimentell)
0,6215	45,33	1,65	0,37	0,40
0,6975	45,09	1,66	0,42	0,40
0,6842	44,33	1,68	0,40	0,40

Bei in vitro Versuchen kann die Genauigkeit der Methode durch die Bestimmung der Masse des Rückstandes ermittelt werden. Aus der Rückwaage wird der prozentuale Abbaugrad bestimmt. Die unlösliche Asche muss dann in dem Verhältnis ansteigen, in dem sich die Gesamtmasse verringert. In Tabelle ist das für drei Proben eines Versuches dargestellt. Die Ausgangsmasse betrug 75 g. Aus dem Quotienten der Massen vor und nach dem Versuch und der in den Proben bestimmten Werte für die unlöslichen Aschen kann der SURA-Wert für das Ausgangsfuttermittel theoretisch errechnet werden. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung der aus den Proben berechneten SURA-Werte des eingesetzten Futtermittels mit den experimentell bestimmten Werten.

6.1.1.4 Ziele von in vitro Methoden

In vitro Versuche sollen mit wenig materiellem, finanziellem und versuchstechnischem Aufwand die natürlichen Bedingungen nachstellen. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, sollten die natürlichen Bedingungen möglichst genau simuliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde als Maß für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden der über den internen Marker bestimmte Masseverlust verwendet. Ziel der in vitro Methode sollte es sein, sich dem Masseverlust aus der in vivo Verdauung (Jungsauenaufzuchtfutter: 60%; rohe Kartoffeln 17%) anzunähern.

Generell muss unterschieden werden zwischen Abbau des Futtermittels, worunter die Überführung von Masse aus der festen in die flüssige Phase zu verstehen ist, und der aus diesem

Grund gravimetrisch bestimmt werden kann, und dem Abbau schon gelöster hochmolekularer Stoffe zu niedermolekularen Verbindungen. Dieser Abbau kann, da sowohl Produkte als auch Ausgangsstoffe in Lösung vorliegen, nicht gravimetrisch erfasst werden. Deshalb kann zwar der gravimetrisch messbare Aufschluss beendet sein, aber nicht der weitere Abbau von gelösten Stoffen.

6.2.2 Aufschluss und Abbau von Futtermitteln in vitro

6.2.2.1 Abbau von Stärke

Mit der entwickelten gravimetrischen Methode konnte der Abbau von Stärke (Abbau mit Amylase: 5.2.1.2) aus den Futtermitteln sehr genau verfolgt werden. Dadurch konnten Erkenntnisse gewonnen werden, welche Einwirkzeiten z.B. für Enzyme im Rahmen einer Verdauungssimulation nötig und sinnvoll sind.

In den ersten 60 Minuten tritt beim Einwirken von α -Amylase ein signifikanter Masseverlust von ca. 8% auf, der durch die stärkeabbauende Wirkung der α -Amylase verursacht wird. Bei Inkubation mit dem entsprechenden Puffer ohne Enzym konnte ein signifikant niedrigerer Masseverlust von 5% festgestellt werden. Dieser beruht auf dem Herauslösen von in Wasser löslichen Stoffen, die in den Futtermitteln enthalten sind (z.B. Salze, Zucker). Durch den Nachweis von Polysacchariden kann der erfolgte Abbau näher charakterisiert werden. Erwartungsgemäß konnten in mit α -Amylase inkubierten Futtermittelproben wesentlich mehr Disaccharide nachgewiesen werden. Höherkettige Oligosaccharide waren nur in den mit α -Amylase versetzten Proben zu finden. Die Ein- und Zweifachzucker in den Proben ohne Enzym sind in den Futtermitteln schon von Anfang an enthalten. Es könnte sich um Saccharose (Disaccharid) und Fruktose oder Glucose (Monosaccharide) handeln.

Untersuchungen haben ergeben, dass Einwirkzeiten von α -Amylase, die 60 Minuten überschreiten, wenig sinnvoll sind, da nach dieser Zeit keine signifikanten Änderungen des Masseverlustes mehr festzustellen sind. Unter Berücksichtigung der natürlichen Vorgaben (der Verbleib der Nahrung im Maul von Schweinen ist sehr kurz) erscheint diese Beobachtung plausibel. Allerdings kann die α -Amylase auch nach dem Abschlucken noch wirken. Im Magen wird der Nahrungsbrei erst allmählich von der Magensäure durchdrungen, was zur Inaktivierung der α -Amylase führt. Zu kurze Einwirkzeiten wirken sich aber nicht im Sinne eines eventuell unvollständigen Abbaus aus, da auch beim später erfolgenden Abbau im Dünndarm α -Amylase beteiligt ist.

Deshalb wird in vielen Verdauungssimulationen auf die Inkubation mit α -Amylase verzichtet (Almaas *et al.* 2006, Simonato *et al.* 2001, Pasini *et al.* 2001). Die im Kapitel 5.2.1.1 erfolgten Untersuchungen zeigen jedoch einen wesentlichen Einfluss der Inkubation mit α -Amylase auf die nachfolgenden Verdauungsschritte. Durch Weglassen der Simulation der Mundhöhlenverdauung sinkt der Masseverlust deutlich. Damit entfernt sich die Simulation von dem natürlichen Vorbild und es ist demzufolge nicht sinnvoll, diesen Schritt wegzulassen.

6.2.2.2 Aufschluss und Abbau von Proteinen

Der größte Masseverlust tritt bei der Inkubation mit Salzsäure und Pepsin auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass der größte Anteil der Lösung aus der festen Phase während der Verdauung im Magen geschieht. Die ersten Versuche zum Abbau von Futtermitteln mit HCl bzw. Pepsin-HCl zeigten keinen Unterschied im Masseverlust bei Inkubation mit Salzsäure mit und ohne Pepsin (siehe Kapitel 5.2.2.2). Die Messungen erfolgten im Intervall von einer 1 h über 4 h (siehe Abb. 13). Ursache hierfür kann der Verlust der Aktivität des Pepsins sein. Wie in Kapitel 5.2.2.1 gezeigt werden konnte, sinkt die Pepsinaktivität nach 1 h auf die Hälfte und nach 2 h ist keine Aktivität mehr nachweisbar. Gründe können der Anstieg des pH-Wertes und der Selbstabbau des Pepsins sein. Deshalb scheint vorwiegend die aufschließende Wirkung der Salzsäure für den Masseverlust verantwortlich zu sein.

Erfolgt die Zugabe von Pepsin mehrmals (inklusive pH-Neueinstellung), so kann ein signifikant höherer Masseverlust erreicht werden, als bei einmaliger Pepsinzugabe ohne pH-Regulierung. Pepsin wurde alle 30 Minuten erneut zugegeben (10 Mal) und der pH-Wert neu eingestellt. Die Kontrolle wurde nur mit Salzsäure inkubiert und ebenfalls alle 30 Minuten der pH-Wert neu eingestellt. Es kommt zu einem signifikanten Unterschied des Masseverlustes im Vergleich zum Abbau durch einmalige Zugabe der physiologischen Pepsinaktivität. Dieser Masseverlust kann auch durch eine einmalige Zugabe der über das Intervall zugegebenen Gesamtpepsinmenge (10 fache physiologische Pepsinkonzentration) und einer alle 30 Minuten erfolgenden pH-Wert Neueinstellung erreicht werden.

Die mehrmalige Zugabe mit pH-Neueinstellung kommt dem natürlichen Vorbild am nächsten, da auch hier eine ständige Sezernation von HCl und Pepsin erfolgt. Da hier der Maßstab für die *in vitro* Verdauung der Abbaugrad ist, sind beide Möglichkeiten gleichberechtigt. Aufgrund des geringeren experimentellen Aufwandes wird die einmalige Zugabe der 10fachen physiologischen Pepsinkonzentration favorisiert.

Der Anstieg des pH-Wertes während der Inkubation mit HCl oder Pepsin/HCl ist eine Folge der Aufschlussreaktionen. Der Anstieg beträgt bis zu eine pH-Einheit, und kann somit bei

einmaliger Zugabe von Pepsin/HCl ohne pH-Regulierung durchaus zur Inaktivierung des Pepsins führen. Nach der dritten Inkubation bleibt der pH-Wert bei mehrmaliger Zugabe konstant.

Zusammenfassend ist bei kurzer Inkubationszeit kein Unterschied zwischen Pepsin und Pepsin- HCl Inkubation festzustellen, während sich bei längeren Inkubationszeiten der Abbau durch Zugabe von aktivem Pepsin erhöht. Somit scheint die Wirkung der Salzsäure in der ersten Phase der Verdauung von entscheidender Bedeutung zu sein, während der Abbau durch Pepsin noch keine größere Rolle spielt. Es erfolgen erst der Aufschluss durch HCl und dann der Abbau der aufgeschlossenen und somit frei zugänglichen Proteine. Bei der in Abbildung 15 dargestellten Inkubation über 4 h erfolgte die Pepsinzugabe nur einmal, und der pH-Wert wurde während der Inkubation nicht mehr nachgestellt. Da Pepsin aber erst nach erfolgtem Aufschluss durch die Salzsäure zu Wirken beginnt, war die Aktivität des Pepsins schon zu niedrig, um noch einen Einfluss auf den Abbau haben zu können. Dass dieser existiert zeigen die Untersuchungen mit mehrmaligen Zugaben oder die Zugabe einer sehr viel höheren Pepsinmenge. In diesen Fällen scheint zuerst der Aufschluss durch HCl zu erfolgen. Wenn dieser erfolgt ist, ist aber immer noch (wegen der sehr hohen zugegebenen Aktivität) oder wieder (wegen der mehrmaligen Zugabe) Pepsinaktivität im Ansatz vorhanden. Dadurch kommt es jetzt zum erhöhten Abbau von Substrat durch Pepsin.

Der Abbau der mittels Salzsäure freigesetzten Proteine durch Pepsin geschieht sehr schnell. Dieser Abbau kann nicht mehr durch gravimetrische Methoden sichtbar gemacht werden, da es sich um den weiteren Abbau von bereits gelösten und sich somit in der flüssigen Phase befindlichen Substraten handelt.

Die eingesetzte Aktivität hat keinen großen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Abbaus, da bereits geringe Mengen an Pepsin zu einem vollständigen Abbau der Proteine führen, der schon nach wenigen Minuten beendet ist. Durch Zugabe der entnommenen Probe zu vorgelegter gesättigter TRIS-Lösung und sofortiger Inaktivierung des Pepsins konnte die Dauer des Abbaus von BSA mit zwei Minuten bestimmt werden. Danach bleibt die Anzahl der freien Gruppen konstant, was auf ein Ende des Abbaus schließen lässt.

Aus diesen Gründen sind nach 15 Minuten auch keine rekombinanten Proteine mehr nachweisbar. Dieser schnelle Abbau durch Pepsin wird auch durch die Untersuchungen mit TNBS bestätigt. Dabei wurden die freien Aminogruppen mit TNBS bestimmt, die beim Abbau der Proteine entstehen (Abb. 16). Der schnelle Abbau von u.a. rekombinant exprimierten Proteinen durch Pepsin wird durch die Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass gereinigtes Cry1Ab (Bt-Toxin) aus transgenem Mais bereits nach

ca. 30 Sekunden vollständig abgebaut ist. Wird das Protein vor der *in vitro* Verdauung erhitzt, verkürzt sich die Abbaupzeit auf 20 Sekunden (Okunuki *et al.* 2002). Auch bei anderen Proteinen kommt es zu einem vollständigen Abbau (Kalgaonkar und Lonnerdal 2008; Bejjani *et al.* 2007). dagegen gibt es einige wenige Proteine, die eine Resistenz gegen den Abbau durch Pepsin zeigen, zum Beispiel die infektiöse Form des Prionproteins (Madec *et al.* 1997), 2S Albumin aus Sesamsamen und ns-LTP aus Weintrauben (Moreno 2007).

Im PAA-Gel kann der Abbau auch optisch verifiziert werden. Als Proteingemisch wurde Milchpulver verwendet, welches aus vier unterschiedlich großen Hauptbestandteilen (ca. 20 bis 25 kDa) besteht, die im Gradienten-PAA-Gel (4%-20%) sichtbar werden. Diese sind nach dem Abbau durch Pepsin nicht mehr vorhanden. Dagegen ist im Größenbereich von ca. 17 kDa ein Peptid zu erkennen und im Bereich von 5 bis 10 kDa ebenfalls. Diese sind aber sehr gering konzentriert, und können nur einem geringen Anteil der Ausgangsmenge des Milchpulvers entsprechen. Auch die Bestimmungen mit BRADFORD aus den Versuchen mit Pflanzenmaterial zeigen eine starke Abnahme der Proteinmenge in den ersten Minuten. Ebenfalls zu erkennen ist der Abbau des Pepsins durch sich selbst, was auch den Aktivitätsverlust des Pepsins erklärt.

6.2.2.3 Aufschluss und Abbau durch Pankreatin und Gallenextrakt

Im dritten Teil der Verdauung werden Enzyme aus dem Pankreas und der Galle in den Dünndarm sezerniert. Die bei der Magenverdauung entstehenden Polypeptide werden im Dünndarm durch die Enzyme des Pankreas in Tri- und Dipeptide sowie Aminosäuren gespalten.

Viele Verdauungssimulationen enthalten diesen Schritt (Glahn *et al.* 2002), einige wenige lassen ihn weg (Liu *et al.* 2004). Dabei ist dieser Schritt nicht nur wichtig für den weiteren Abbau der Spaltprodukte des Pepsins, sondern auch der Abbau von Fetten geschieht durch die Elastase des Pankreas. Wichtig für die enzymatischen Reaktionen ist die Neutralisation der Salzsäure aus der Pepsininkubation. Die Enzyme des Pankreas benötigen einen pH-Wert von 6,8. Mit der Konzentration an Hydrogenkarbonat der in der Literatur beschriebenen Modelle (z.B. 0,1 M Oomen *et al.*) konnte die Neutralisation der Salzsäure nicht in ausreichendem Maße erfolgen, da das Gesamtvolumen eine noch handhabbare Menge nicht überschreiten sollte. Deswegen wurde die Salzsäure durch Zugabe von festen Natriumhydrogenkarbonat neutralisiert und erst dann die Pankreatin/Gallenextrakt-Lösung zugegeben.

Der Abbau von Futtermitteln durch Pankreatin und Gallenextrakt lässt sich nicht mit der bisher verwendeten gravimetrischen Methode untersuchen, da es durch das Pankreatin-Gallen-Gemisch zum Verstopfen der Glasfildertiegel kommt. Dadurch kann die flüssige Phase nicht

durch Absaugen entfernt werden, sondern es muss eine Trennung durch Zentrifugation erfolgen. Die anschließenden Analysen erfolgen dann wieder gravimetrisch. Die gravimetrischen Ergebnisse, die mit diesen unterschiedlichen Trennmethoden gewonnen werden, sind jedoch nicht vergleichbar. Dies könnte an erhöhten Fehlern liegen, da es nicht immer gelang, die Flüssigkeit vollständig und ohne die Mitnahme von festen Partikeln zu dekantieren. Deswegen mussten alle Verdauungsschritte nochmals mit einer Trennung durch Zentrifugation untersucht werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Dabei ist eine signifikante Erhöhung des Masseverlustes durch die pankreatischen Enzyme zu erkennen. Nach dem Abbau durch Amylase (ca. 10%) bzw. Pepsin (33 %) steigt der Abbau durch Pankreatin und Gallenextrakt auf 47 % an, und kommt damit den Werten aus der in vivo Verdauung recht nahe (Diamond et al. 1997). Die Wirkung könnte auf dem Abbau der Lipide durch die Enzyme beruhen. Dadurch kann es zum Aufbrechen von Lipidmembranen und daraus bestehenden Vesikeln kommen. Die zuvor dem Wasser nicht zugänglichen, da von den lipophilen Lipiden umgebenen, Futtermittelbestandteile sind jetzt für den Abbau durch die in wässriger Lösung vorliegenden Enzyme verfügbar. Auch die emulgierende Wirkung der Gallensäuren kann für den Masseverlust mitverantwortlich sein, da dadurch wasserunlösliche Stoffe in Micellen gelöst werden können, und somit in die wässrige, dann entfernte Phase gelangen.

Dass der Abbau auch auf die Wirkung der Enzyme zurückzuführen ist, kann durch den Nachweis der Enzymreaktionen ermittelt werden. Dabei müssen die durch die Enzyme katalysierten Reaktionen getrennt untersucht werden.

Der Abbau der bei der Spaltung durch Pepsin entstehenden Polypeptide durch Pankreatinlösung wird durch ein Gradienten-PAA-Gel sichtbar gemacht. Sowohl die durch Pepsin entstandenen Polypeptide, als auch die mit Pankreatin eingebrachten Proteine werden vollständig abgebaut. Auch durch die Zunahme der freien Aminogruppen konnte im zeitlichen Verlauf der Abbau der Proteine nachgewiesen werden.

Zum Nachweis des Abbaus der Fette zu Fettsäuren und Glycerin wurde zuerst das Rohfett nach Weender gravimetrisch bestimmt. Es ergaben sich aber mit dieser Methode keine Unterschiede in der Masse des Rohfetts vor und nach der in vitro Verdauung. Ursache ist die Wasserunlöslichkeit der bei der Spaltung der Fette entstehenden Fettsäuren. Auch im abgebauten Zustand lösen sie sich nicht in der wässrigen, dann entfernten Phase, und werden genauso wie die unabgebauten Fettsäuren bei der Extraktion des Rohfetts mit Petrolether in die Rohfettfraktion überführt. Der Nachweis des Fettabbaus erfolgte deshalb per Dünnschichtchromatographie. Hier zeigte sich aber auch in den Proben, die nicht mit Enzymen behandelt worden waren ein Abbau der Fette zu Fettsäuren und Glycerin. Die Ursache hierfür lag wahrschein-

lich an der Aufschlussmethode der Weender Futtermittelanalyse (30 min in 4 M HCl kochen). Dabei wurden die Fettsäuren durch die HCl hydrolysiert. Um dies zu verhindern wurde der Aufschlussprozess geändert. An die Stelle des thermischen, sauren Aufschlusses kam ein mechanischer Aufschluss mit einer Kugelmühle. Hierbei entsteht ein sehr feines (staubähnliches) Mahlgut, aus welchem sich anschließend mittels einer 24 h Kaltextraktion, wie bei der Weender-Analyse mit Petrolether, in einem Rundkolben die Rohfette isolieren ließen. Nach Filtration wird vom Filtrat der Petrolether abdestilliert, und das Rohfett kann als Massedifferenz zum Leergewicht der Kolben ermittelt werden. Es konnten zwar keine Unterschiede in den Massen der Rohfettfraktion festgestellt werden. Bei der anschließenden chemischen Untersuchung der Zusammensetzung des Rohfetts konnte allerdings der alleinige Abbau durch die Enzyme der in vitro Verdauung nachgewiesen werden.

Die Banden der freien Fettsäuren und Triglyceride konnten anhand von Standards identifiziert werden. An Proben wurden sowohl das Ausgangsfutter als auch zwei Proben der in vitro Verdauung (einmal aus einem Ansatz mit Enzymen und einmal aus der Kontrolle ohne Enzymzugabe) untersucht. Es wurden jeweils Proben aus mehreren Wiederholungen aufgetragen.

Es zeigen sich in den wichtigen Banden Übereinstimmungen der Muster der unbehandelten Probe und der Proben der in vitro Verdauung ohne Enzyme. In beiden Fällen waren unabgebaute Triglyceride zu erkennen. Die Bande der freien Fettsäuren hatte in beiden Fällen annähernd die gleiche Intensität (es wurden gleiche Mengen aufgetragen). Nur bei den Proben, die dem Einfluss von Enzymen ausgesetzt waren, trat keine Bande im Bereich der Triglyceride auf. Dafür konnte eine deutliche Zunahme der Intensität der freien Fettsäuren festgestellt werden. Durch einen enzymatischen Nachweis von Triglyceriden wurden diese visuellen Beobachtungen verifiziert. Dabei wurden mittels eines Kits eventuell vorliegende Triglyceride abgebaut, und das Glycerin in einer Enzymreaktion sowie anschließend spektroskopisch nachgewiesen. Einzig in den mit Enzymen behandelten Proben konnte kein Glycerin mehr nachgewiesen werden. Ursache hierfür ist die Wasserlöslichkeit von Glycerin, welches sich dadurch während der in vitro Verdauung, wenn es nach der Spaltung der Fette frei vorliegt, in der wässrigen Phase löst, und bei der Phasentrennung aus dem Ansatz entfernt wird. Ohne Enzymeinwirkung liegt das Glycerin in den in wasserunlöslichen Fetten vor, und bleibt in der festen Phase enthalten.

6.2 In vivo Verdauung

(Andre Kacholdt)

Der Abbau von Futtermitteln in vivo kann nur indirekt über sich unterschiedlich verändernde Bestandteile der Weender Analyse erfolgen. Ein Nachweis der Abbauprodukte oder des vollständigen Abbaus von einzelnen Nahrungsbestandteilen ist wegen der endogenen Sekretion nicht möglich. Durch die endogene Sekretion ist es nicht möglich den Ursprung von nachgewiesenen Verbindungen eindeutig dem Abbau aus der Nahrung zuzuordnen. Freie Fettsäuren können sich auch bilden, wenn Zellen der Darminnenwand abgerieben werden und anschließend abgebaut werden. Ebenso kann auch bei Peptiden und Aminosäuren nicht entschieden werden, ob es sich um Abbauprodukte handelt oder um endogene Sekretion, zum Beispiel aus abgeschliffenen Zellen freigesetzte Peptide oder Aminosäuren oder Proteine aus dem Pankreas. Somit kann das Vorhandensein der Abbauprodukte nicht als Beweis für den Abbau von Futtermitteln gewertet werden. Nur der Abbau der gentechnisch eingebrachten Proteine wäre mittels ELISA direkt messbar, wenn die entsprechenden Antikörper verfügbar sind. In diesem Fall kann auch nur der nichterfolgte Abbau nachgewiesen werden, da in diesem Fall das noch vorhandene Protein detektiert werden kann. Ob die Abbauprodukte nachweisbar sind, hängt von der Erhaltung der Epitope ab.

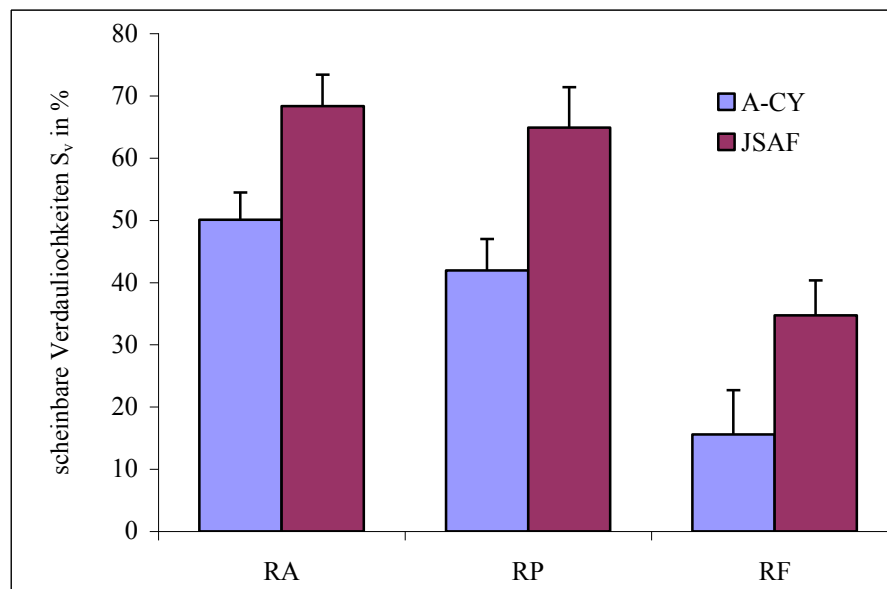


Abb. 43: scheinbare in vitro Verdaulichkeiten von Jungsauenaufzuchtfutter (JSAF) und Kartoffeln (A-CY)

Anhand des internen Markers kann der Abbau des Futters in der Gesamtheit sehr gut nachvollzogen werden. Da der Marker absolut betrachtet konstant bleibt, die Bezugsgröße sich aber durch die Resorption verringert, ist die prozentuale Zunahme des internen Standards ein Maß für die Resorption des Futtermittels. Aus dem Ansteigen des internen Markers auf ca.

200 % des Ausgangswertes im Futtermittel kann auf einen Abbau von 50% des Futtermittels geschlossen werden. Bei dem, die rohen Kartoffeln enthaltenden, Futtermittelgemisch A-CY kann ein Abbau von 26 % errechnet werden.

Angaben über die Änderung der Gehalte an den Fraktionen der Weender-Analyse (im Futtermittel und dem Inhalt des Verdauungstraktes) können mit der scheinbaren Verdaulichkeit (S_v) angegeben werden. Dabei wird der Abbau der jeweiligen Anteile prozentual angegeben. Die Einflüsse der endogenen Sekretion bleiben unberücksichtigt. Deshalb handelt es sich um die scheinbare Verdaulichkeit. Für die Bestimmung der wahren Verdaulichkeit (W_v) müsste vorher jeweils der endogene Anteil durch eine Fütterung mit einem jeweiligen parameterfreien Futtermittel ermittelt werden, und von der scheinbaren Verdaulichkeit subtrahiert werden. In den Abbildung 46 sind die scheinbaren Verdaulichkeiten für zwei verschiedene Futtermittel dargestellt. Bei A-CY handelt es sich um ein Futtermittelgemisch (1000g rohe Kartoffeln und 600 g Jungsauenaufzuchtfutter). Über die scheinbaren, ilealen in vivo Rohproteinverdaulichkeiten der einzelnen Komponenten und deren Mischungsverhältnis ist es möglich die Verdaulichkeit des Gemisches zu berechnen. Drochner *et al.* hat 1988 die ileale (18,7 %), colonale (25,1 %) und die scheinbare Gesamtverdaulichkeit (42,4 %) von Rohprotein bei der Verfütterung von rohen Kartoffeln an Schweinen bestimmt.

Tab. 21: scheinbare, ileale in vivo Verdaulichkeiten des Rohproteins verschiedener Futtermittel in %

	Pell. Futter	rohe Kart. (Drochner <i>et al.</i>)	A-CY (Gemisch)	A-CY (Gemisch)
			Bestimmt	berechnet
S_v (RP) in vivo	64,88	18,7	41,93	35

Der berechnete Wert für die Rohproteinverdaulichkeit des Futtermittelgemisches beträgt 35 %, und liegt niedriger als das bestimmte Ergebnis von 42 % (Tab. 21). Dabei sind die prozentualen Anteile der rohen Kartoffeln und des pelletierten Futters im A-CY Gemisch zu berücksichtigen, welches sich nicht zu gleichen Teilen aus den beiden Komponenten zusammensetzte. Auch die bei Drochner *et al.* 1988 ermittelten Rohproteinverdaulichkeiten von Futtermittelgemischen liegen zwischen den Rohproteinverdaulichkeiten der einzelnen Komponenten.

6.3 Entwicklung einer in vitro Methode

(Andre Kacholdt)

Aus den Untersuchungen zu den Wirkungen der Enzyme, den ermittelten natürlichen Werten und Angaben aus verschiedenen Literaturquellen ist die Methode zum in vitro Abbau von Futtermitteln entwickelt worden.

Wie schon in verschiedenen anderen Arbeiten gezeigt wurde, sind alle drei Verdauungsschritte in vitro simulierbar. Der Grad des Abbaus der einzelnen Substrate durch die Verdauungsenzyme lässt sich in vitro gut simulieren und auch quantitativ bestimmen. Der Abbau aller drei Hauptbestandteile der Nahrung (Polysaccharide, Proteine und Fette) konnten sowohl durch den Nachweis der Reaktionsprodukte als auch durch den Abbau der Ausgangsstoffe eindeutig nachgewiesen und quantifiziert werden.

Viele in vitro Methoden verzichten auf die Simulation des Abbaus der Polysaccharide durch α -Amylase im Mund. Die entwickelte in vitro Verdauung soll jedoch die Verdauung des Monogasters simulieren. Der Speichel von Menschen und die Schweine, als wichtigste Vertreter der Monogaster) enthält Speichelamylase. Deshalb wurde die Inkubation mit α -Amylase als essentieller Schritt der Simulation der Verdauung bei Monogastriern erachtet, so dass nur eine dreistufige Simulation in Betracht kommt. Diese Ansicht wird von den Ergebnissen unterstützt, die zeigen, dass sich die Abbaugrade zweier konstanter Versuchsfuttermittel signifikant voneinander unterscheiden, wenn der eine vorher mit α -Amylase inkubiert wird. Da als Maßstab der Qualität der in vitro Verdauung die maximale Annäherung des Masseverlustes an den der in vivo Verdauung angesehen wird, sollte eine, sich an der Natur orientierende in vitro Methode den Schritt der Verdauung in der Mundhöhle ebenfalls abbilden.

Bei allen drei Verdauungsstufen konnten anhand der zeitlichen Verläufe des Masseverlustes Mindestbehandlungszeiten in einer in vitro Methode ermittelt werden (Tab. 22).

Tab. 22: Mindestinkubationszeiten bei den einzelnen Verdauungsschritten

Verdauungsschritt	Mund	Magen	Dünndarm
Mindestinkubationszeit	30 min	3 h	3 h

6.3.1 Simulation der Mundhöhlenverdauung

Die gewählte Inkubationsdauer bei α -Amylase orientiert zum einen an in der Literatur verfügbaren Methoden, in welchen eine 30 minütige Inkubation mit Amylase enthaltenden Puffer zur Simulation der Mundhöhlenverdauung verwendet wird. Dies stimmt der natürlichen Einwirkzeit überein, wenn man die spätere Inaktivierung im Magen berücksichtigt. Bei der Bestimmung der Einwirkdauer muss die erst allmählich erfolgende Durchmischung des Nah-

rungsbreis im Magen berücksichtigt werden. Somit in die erforderliche Inkubationszeit nicht gleichzusetzen mit der Zeit, die beim Schwein von der Nahrungsaufnahme bis zum Abschlucken vergeht. Bei in vitro Verfahren wird jedoch aufgrund der besseren Durchmischung mit erhöhtem Flüssigkeitseinsatz gearbeitet. Deshalb kommt es in vitro, im Gegensatz zu in vivo, aufgrund der besseren Durchmischung zu einer sofortigen Inaktivierung der α -Amylase. Die Zeitspanne, die diese in vivo noch im Magen aktiv ist, muss in vitro beim ersten Schritt mit simuliert werden.

Da auf der anderen Seite Inkubationszeiten von mehr als einer Stunde keinen Einfluss auf den Abbau haben, und anhand der molekularbiologischen Untersuchungen zum Abbau der Polysaccharide gezeigt werden konnte, dass die vorhandenen Mehrfachzucker innerhalb von wenigen Minuten abgebaut sind, ist eine Reaktionsdauer von 30 Minuten festgelegt worden. Dies ist auch eine gute Annäherung an die natürlichen Bedingungen, da im Magen eine Zeitdauer von ca. 30 Minuten bis zur vollständigen Durchmischung des Futters mit Magensäure angenommen werden kann. Erst diese ist es schließlich, die durch die Verringerung des pH-Wertes auf ca. zwei bis drei zur Inaktivierung der α -Amylase führt, und somit den Abschluss für diese Reaktion bildet.

6.3.2 Simulation der Magenverdauung

Im Anschluss wird der Abbau der Proteine durch Pepsin simuliert. Dieser Schritt fiel in der Literatur durch die Vielzahl an beschriebenen methodischen Parametern auf. Durch Orientierung am Vorbild Schwein und den Untersuchungsergebnissen konnte ein sich an den notwendigen und natürlichen Bedingungen orientierender Simulationsschritt entwickelt werden. Der diesem zugrunde liegende pH-Wert ist durch Untersuchungen am Tier bestimmt worden.

Da Pepsin bei pH-Werten über 4 irreversibel deaktiviert wird, ist es zwingend notwendig, schnellstmöglich nach Zugabe von Pepsin/HCl-Lösung den pH-Wert von ca. 6,0 - 6,5 auf ca. 1,5 - 2,0 abzusenken. Um die mit der Amylase zugesetzte Pufferkapazität zu verringern, wurde die Amylasekonzentration erhöht, und somit das Puffervolumen und auch die Pufferkapazität verringert. Falls dies nicht ausreichen sollte, um den notwendigen niedrigen pH-Wert zu erreichen, wurde dieser mit konzentrierter Salzsäure eingestellt.

Da es während der Verdauung im Magen ständig zur Freisetzung von Pepsin kommt, wurde der Einfluss eines Verdauungsmodells untersucht, in dem mehrmals Pepsin zugegeben wird. Dabei konnte ein mit zunehmender Anzahl an Pepsinzugaben steigender Abbaugrad festgestellt werden, der wesentlich über dem der einmaligen Pepsinzugabe lag. Die Unterschiede im Abbaugrad wurden aber mit weiteren Zugaben immer geringer, und nach neun Zugaben

konnte kein weiterer Masseverlust mehr festgestellt werden, so dass davon ausgegangen wird, mit neun nacheinander erfolgenden Pepsinzugaben ist der maximal mögliche in vitro Abbau erreicht. Nach sechs Zugaben lag der Abbaugrad bei über 95 % des maximal erreichbaren Abbaus, weswegen dies als ausreichend angesehen wurde. Dieser Abbaugrad reicht näher an die natürlichen Bedingungen heran, als bei der einmaligen Zugabe einer physiologischen Pepsinkonzentration. Spätere Versuche zeigten aber, dass es auch mit einmaligen Zugaben von Pepsin möglich war, einen so hohen Abbaugrad zu erreichen. Dazu musste allerdings wesentlich mehr als die physiologische Pepsinaktivität zugegeben werden. Da sich durch eine einmalige Zugabe der Versuchsaufbau wesentlich vereinfacht, wird die Magenverdauung mit einer einmaligen Zugabe einer unphysiologischen Aktivität simuliert, deren Ergebnis aber mit einem, die in vivo Verdauung nachahmenden Versuchsdesign sehr gut übereinstimmt.

6.3.3 Simulation der Dünndarmverdauung

Die Einbeziehung der Enzyme, die in der Bauchspeicheldrüse gebildet werden (z.B. Aminopeptidasen; Qiao 2004) in die in vitro Systeme ist schwierig, da sie in der Vielzahl nicht einzeln kommerziell verfügbar sind. Deshalb werden, in Übereinstimmung mit verschiedenen, bereits publizierten Quellen, nicht die reinen Enzyme, sondern ein natürliches Enzymgemisch, das Pankreatin verwendet. Dazu wird die Verwendung von Gallenextrakt, gebildet in der Leber und für die Emulgierung der Fette verantwortlich, empfohlen. Die Inkubation mit Pankreatin und Gallenextrakt musste wie schon beschrieben anders untersucht werden. Es konnten weder in vivo Daten ermittelt werden, noch gelang es die Reaktion gezielt zu beenden und somit Zeitverläufe des Abbaus zu bestimmen. Da aber die in vivo Verweildauern zu den vorliegenden in vitro Methoden passten, wurde dieser Schritt aus der Literatur übernommen. Es konnte nachgewiesen werden, dass zur optimalen Simulation (maximaler Masseverlust) die Zugabe beider Substanzen nötig ist.

in vitro Verdauungssimulation nach Bruch und Kacholdt:

Simulation der Mundverdauung:	10 U/ml α -Amylase 30 Minuten bei 37°C
Simulation der Magenverdauung:	200 U/ml Pepsin 3 h in 0,01 M HCl (pH=2,0)
Simulation der Dünndarmverdauung:	2 h je 4 g/l Pankreatin und Gallenextrakt in 0,2 M NaHCO ₃ 3 h bei 37°C

Abb. 44: Schema der entwickelten in vitro Simulation

Durch diese Versuche konnte die Simulation von Oomen *et al.* 2002 übernommen werden, da gezeigt worden ist, dass diese den natürlichen Bedingungen sehr nahe kommt. Danach erfolgt durch Zentrifugation die Trennung der Feststoffe von der flüssigen Phase. Dies entspricht der Resorption, da alles in Flüssigkeiten Gelöstes resorbierbar ist. Die flüssige Phase kann nun auf Abbauprodukte untersucht werden.

6.3.4 Vergleich des in vivo und in vitro Abbaus

Ein Tierversuch stellte die Basis für den Vergleich von in vivo und in vitro Abbau der Futtermittel dar. Die Tiere wurden mit Jungsauenaufzuchtfutter sowie transgenen Kartoffeln gefüttert. Der Transport der rekombinanten Proteine in den Organismus, der in vivo Abbau des Futtermittelgemischs und der Vergleich mit dem in vitro Abbau sowie der Abbau der rekombinanten Proteine in Verlauf der Verdauung sollte untersucht werden. Dazu wurden die Tiere getötet und Proben aus den verschiedenen Abschnitten des Verdauungssystems entnommen.

Der Abbau von Futtermitteln wurde mittels der Weender Analyse untersucht. Zwar ist ein in vitro Ansatz frei von endogenen Substanzen, die die Analyse verfälschen, aber der Aufwand einer Quantifizierung über die Abbauprodukte ist deutlich höher anzusehen als über die Weender Analyse. Des Weiteren sind beide Verdauungsvarianten besser miteinander vergleichbar, wenn sie mit denselben Methoden untersucht werden.

Bei der Bestimmung der scheinbaren Verdaulichkeiten in vivo kommt es zu sehr starken tierindividuellen Unterschieden bei der Bestimmung der Markerkonzentration (SURA von 0,46 % TS bis 1,45 %TS) im Chymus der Tiere. Da diese sich sehr stark auf die scheinbaren Verdaulichkeiten auswirkt, unterliegen auch diese Werte sehr starken Schwankungen.

Tab. 23: S.E. in % des Mittelwertes bei verschiedenen in vivo und vitro Bestimmungen

verschiedene <i>in vitro</i> Verdauungsprofile (JSAF)				A-CY in vitro	A-CY in vivo	JSAF Magen	JSAF Ileum
3,19 %	3,01%	1,77 %	2,54 %	2 ,16 %	5,38 %	31,62 %	6,3 %

Das betrifft vor allem die SURA-Werte der Magenproben, bei denen der kleinste Wert 0,46 und der größte Wert 1,45 beträgt. Beim Ileum sind die Werte homogener, allerdings beträgt der Stichprobenumfang auch nur fünf, im Vergleich zu den Magenproben, bei denen ein n = 10 erreicht werden konnte (bei der Hälfte der Tiere kam es zu Defekten des Darmes und daher konnten keine Proben entnommen werden). Da diese SURA Werte aber einen entscheidenden

Einfluss auf die scheinbaren Verdaulichkeiten haben, kommt es auch hier zu entsprechenden Abweichungen.

Bei der Verdauung *in vitro* wurden jeweils drei parallele voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Abweichungen sind hier wesentlich geringer. Somit ist die *in vitro* Methode unter dem Gesichtspunkt der Homogenität der Ergebnisse wesentlich besser geeignet. Der tierindividuelle Einfluss ist hier nicht gegeben. Das ist ein großer Vorteil einer *in vitro* Methode, neben der bereits in der Einführung genannten guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Diese Ergebnisse könnten für die *in vitro* Versuche durch die Erhöhung der Wiederholungen eventuell noch verbessert werden. Da die Werte aber so schon sehr homogen sind, ist die Notwendigkeit fraglich.

Beim *in vitro* Abbau kann der Anteil des Futtermittels, welches durch die Enzyme und Lösungen abgebaut wird, nicht nur indirekt über den internen Marker, sondern auch direkt durch die Differenz der Masse vor und nach dem *in vitro* Verfahren bestimmt werden. Die Methode des internen Markers kann dadurch verifiziert werden (siehe Tab.19). Aus den Daten der Tabelle 23 kann errechnet werden, dass bei der *in vitro* Verdauung von JSAF 40 % des Futters abgebaut werden. Bei der Futtermischung mit den rohen Kartoffeln lässt sich *in vitro* über den internen Marker ein Abbau von nur 13 % errechnen.

In vitro konnten verschiedene Einflussfaktoren untersucht werden, wie zum Beispiel der Einfluss der Korngröße. Für derartige *in vivo* Untersuchung wäre das Töten mehrerer Tiere nötig. Es zeigte sich, dass die Korngröße des Futtermittels bei dem verwendeten Jungsaunaufzuchtfutter keinerlei Einfluss hat.

Tab. 24: scheinbare *in vitro* und *in vivo* Verdaulichkeiten Sv von A-CY und JSAF

Weender Parameter	in vitro		in vivo		
	A-CY	JSAF	A-CY	Drochner	JSAF
RA	29,41	5,51	31,14		68,35
S.E.	0,95	0,45	5,39		5,05
RP	22,33	61,54	51,39	42,4	64,87
S.E.	1,95	2,30	4,18	7,13	6,52
RF	27,30	4,92	25,88		34,69
S.E.	1,14	3,00	5,44		5,62

Beim Abbau von Jungsaunaufzuchtfutter sind die größten Übereinstimmungen zwischen *in vivo* und *in vitro* festzustellen. Stärke wird durch die Weender Analyse nicht erfasst. Der

Rohfettabbau kann ebenfalls nicht durch die Weender Analyse nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.4.6.). Somit ist das Rohprotein der Parameter, der am meisten von der Verdauung beeinflusst wird, da hier der Großteil der Fraktion abgebaut wird und der größte Masseverlust auftritt. Da die in vitro Verdauung mit dem Hintergrund des Abbaus von gentechnisch veränderten Proteinen entwickelt wurde, ist das Rohprotein der bedeutendste der Weender-Parameter. In Tab. 25 sind die scheinbaren in vitro und in vivo Verdaulichkeiten dargestellt. Die Werte sind je nach Futtermittel verschieden und liegen in der Zusammensetzung der Futtermittel begründet. Dieser Unterschied tritt sowohl in vivo als auch in vitro auf, was wiederum als Indiz für eine Übereinstimmung der Ergebnisse der in vitro Verdauung mit dem natürlichen Verdauungsvorgängen aufgefasst werden kann. So sind die Verdaulichkeiten von Futtermittelmischungen, die einen hohen Anteil an rohen Kartoffeln enthalten, signifikant niedriger als die des Jungsauenaufzuchtfutters. Dies ist wahrscheinlich in der Struktur des Futters begründet. So handelt es sich beim Jungsauenaufzuchtfutter um ein gemahlenes und anschließend pelletiertes Trockenfutter, welche keinerlei zelluläre Struktur mehr aufweist. Deshalb liegen alle Stoffe für den Abbau durch Enzyme frei vor. Bei den rohen Kartoffeln dagegen sind die Inhaltsstoffe durch Zellwände gut gegen den Abbau geschützt. Da die Kartoffeln roh verfüttert wurden, sind die Bestandteile auch nicht durch Kochen aufgeschlossen worden.

6.4 Abbau von Proteinen

(Mandy Bruch)

Risiken für die Gesundheit können nur dann von gentechnisch veränderten Proteinen verursacht werden, wenn diese in den Organismus gelangen. Wie bereits erläutert, ist dazu das Herauslösen aus der festen Nahrung nötig. Nur gelöste Bestandteile sind potentiell resorbierbar. Deshalb sind die Betrachtungen der Weender Daten eigentlich nur für die Beurteilung der in vitro Verdauung im Vergleich mit der natürlichen Verdauung wichtig, und nicht für Aussagen über mögliche Gefahren, die durch die Nahrungsaufnahme entstehen können. Zur Einschätzung dieser Gefahren ist ausschließlich eine Betrachtung der flüssigen Phase ausschlaggebend. Die während der Verdauung in den festen Bestandteilen verbleibenden Proteine werden mit ebendiesen am Ende des Verdauungsprozesses wieder ausgeschieden, und können somit keine Gefahr für die Gesundheit des verdauenden Organismus darstellen.

Unter diesen Voraussetzungen finden die für die Allergenität und Toxikologie entscheidenden Prozesse in der flüssigen Phase statt. Die Fragen können aber nicht mehr im Rahmen dieser in vitro Verdauung untersucht werden. Dieses Verfahren kann allerdings ein Substrat zur Verfügung stellen, welches in Übereinstimmung mit den Abbauprodukten im natürlichen Umfeld

steht, zumindest bei den Abbauprodukten der jeweiligen Futtermittel. Somit sollte die flüssige Phase der *in vitro* Verdauung recht gut mit denen übereinstimmen, was man auch im Ileum finden würde.

Der Abbau der Proteine *in vitro* scheint sich bei den untersuchten Proteinen, so zeigen die Untersuchungsergebnisse, nicht vom *in vivo* Abbau zu unterscheiden. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit nur ein Protein *in vivo* untersucht (NPTII). Hier ergaben sich allerdings sehr gute Übereinstimmungen zwischen den beiden Methoden. Überall konnte ein schneller bzw. sofortiger Abbau von NPTII festgestellt werden. Dies deckt sich auch mit den aus der Literatur bekannten Untersuchungsergebnissen (Fuchs *et al.* 2001). Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass aus der Simulation der Dünndarmverdauung keine Proben analysiert werden konnten, da die zugegebenen Verdauungsenzyme die immunologischen Nachweisreaktionen negativ beeinflussten. Alle Versuche (Hitzeinaktivierung, Dialyse) dieses Problem zu lösen, scheiterten. Allerdings bestätigt das Auftreten von NPTII im Duodenum die Ergebnisse aus den Arbeiten von Fuchs *et al.* 2001. Denn nur ein, im Vergleich zum Pepsinabbau, verlangsamter Abbau durch Pankreatin und Gallenextrakt kann das Vorhandensein von intaktem Protein in den ersten Darmabschnitten erklären.

Überhaupt ist der Einfluss der *in vitro* Verdauung auf den Abbau der Proteine recht gering. Dafür sprechen die vielen unterschiedlichen Methoden, die in der Literatur beschrieben sind, und die alle die erfolgreiche Simulation der Verdauung beschreiben. Die Ergebnisse, vor allem unter Betrachtung der Literaturdaten, zeigen ein Bild, bei der die genauen Bedingungen der *in vitro* Verdauung nur eine geringe Rolle spielen. Vielmehr ist die Resistenz gegen den Abbau durch die Verdauungsenzyme eine Eigenschaft der jeweiligen Proteine selbst. Die Aufgabe einer Verdauungssimulation ist es nur, den Verdauungsenzymen einen Zugang zu den Proteinen zu verschaffen, indem sie durch die Wirkung der Salzsäure die Strukturen aufbrechen und für einen Aufschluss der Proben sorgen. Aus diesem Grund kommt auch keine einzige der in der Literatur beschriebenen Methoden ohne diesen Schritt aus. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Schritt der entscheidende für den Aufschluss ist. Der Masseverlust bei der Inkubation mit HCl-Pepsin ist von der Konzentration des Pepsins völlig unabhängig. Des Weiteren ist der Masseverlust (der eine Folge der aufschließenden Wirkung ist) auch ohne Pepsin genauso groß wie bei Anwesenheit von Pepsin. Das Enzym hat somit keinen Einfluss auf den Aufschluss. Aus diesem Grund kann auch die Konzentration bzw. Aktivität des Pepsins keinen Einfluss auf den Aufschluss der Futtermittel haben. Da die Stabilität gegen den proteolytischen Abbau eine Eigenschaft der Proteine ist, kann der genaue Ablauf der *in vitro* Verdauung den Abbau nicht beeinflussen. Allerdings

können die Proteasen nur Proteine abbauen, die in wässriger Lösung vorliegen. Hier kommt nun die Hauptaufgabe der simulierten Verdauung. Sie muss einen, möglichst naturnahen Aufschluss der Substrate ermöglichen. Denn nur dadurch können die Proteine in die wässrige Phase übergehen. Aus diesem Grund erfolgte auch die Entwicklung der meisten *in vitro* Methoden. Sie untersuchen die Bioverfügbarkeit von Substanzen, z.B. Schwermetalle aus belasteten Böden (Oomen *et al.* 2002). Für die Simulation der Bioverfügbarkeit, noch dazu aus derartig strukturlosen, leicht aufschließbaren Erden genügt die einfache Simulation. Da es sich hierbei nicht um organisches Material handelt, spielt auch die Konzentration an Enzymen keine Rolle. Das scheint auch der Grund zu sein, dass in allen Modellen nie nach der Übereinstimmung mit den natürlichen Begebenheiten geschaut wurde. Es ist ausreichend, in diesen Fällen eine einfache Simulation ohne große Verifizierung einzusetzen. Möchte man aber die Verdauung von organischem Material untersuchen, und die Auswirkungen der Abbauprodukte auf die Prozesse im Organismus, so kommt den Enzymen eine entscheidende Rolle zu. Zum einen sind sie es, die zu den Abbauprodukten führen, andererseits beeinflussen sie den Aufschluss beträchtlich, wie zum Beispiel Gallenextrakt. Deshalb ist für die Fragestellung: werden (gentechnisch) veränderte Proteine abgebaut, die wichtigste Erkenntnis, ob sie im Verdauungssystem des entsprechenden Organismus überhaupt freigesetzt werden können, und ob es Faktoren gibt, die diese Freisetzung beeinflussen. Der Abbau selbst sollte, möglich mit gereinigten Proteinen *in vitro* untersucht werden, da eine *in vitro* Verdauung mit komplettem Pflanzenmaterial hier zu komplex ist. Die in den Pflanzen enthaltenen Stoffe könnten die immunologischen Nachweise stören. Sollte allerdings ein gereinigtes Protein nicht verfügbar sein, so kann als Ersatz dieses Protein enthaltende Pflanzenmaterial zum Einsatz kommen. Dagegen kann nur eine solche, wie die hier entwickelte *in vitro* Verdauung das komplexe Gemisch der verschiedensten Oligopeptide und Oligosaccharide annähernd entstehen lassen, das bei der natürlichen Verdauung entsteht. Mit diesem kann anschließend die allergene oder toxische Wirkung der simuliert verdauten Nahrungs- und Futtermittel untersucht werden.

6.4.1 Abhängigkeit der Proteinfreisetzung und des Proteinabbaus vom Pflanzenmaterial

(Mandy Bruch)

Um die Abhängigkeit der Proteinfreisetzung sowie des Proteinabbaus von eingesetzten Pflanzenmaterial und der Art des Ausschlusses zu untersuchen, wurde sowohl frisches als auch gefriergetrocknetes Material eingesetzt. Meist werden in Forschungsprojekten, die sich mit den Auswirkungen von gentechnisch modifizierten Pflanzen auf tierische Organismen und der eventuellen Aufnahme von Fremdproteinen über den Verdauungstrakt beschäftigen, mit ge-

friergetrockneten Materialien gearbeitet. Bedeutung hat die Gefriertrocknung insbesondere bei der Konservierung von wasserhaltigen Probematerialien tierischer oder pflanzlicher Herkunft. Durch den Wasserentzug kann das Ablaufen chemischer Reaktionen, z. B. der Abbau von Proteinen, fast vollständig unterbunden werden. Die Pharmaindustrie setzt Lyophilisat (z.B. bei Antibiotika) darüber hinaus wegen seiner guten Lösungseigenschaften ein (Maier, 2003).

Bei Fütterungs- bzw. Immunisierungsversuchen wird neben Lyophilisat auch Frischmaterial eingesetzt. Auch bei unabsichtlichem Verzehr von transgenen Pflanzen werden diese als Frischmaterial aufgenommen. Aus diesem Grund wurde zunächst die Gesamtproteinfreisetzung aus Kartoffel- und Tabakmaterial, ohne den Einfluss von Abbauprozessen durch Enzyme und HCl, bestimmt. Voruntersuchungen zum Lösungsverhalten haben gezeigt, dass α -Amylase keinen Einfluss auf die Freisetzung des Gesamtproteins hat (Bruch und Kacholdt unveröffentlicht). Deshalb wurde auf den Einsatz von α -Amylase verzichtet. Die Versuche zur Gesamtproteinfreisetzung wurden in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) durchgeführt und auf Unterschiede im Freisetzungsverhalten von Proteinen zwischen gehäckseltem Frischmaterial und Lyophilisat untersucht. Es wurde angenommen, dass der Freisetzungsvorgang des Fremdproteins mit dem des Gesamtproteins korreliert und dass der Häckselvorgang den Kauprozess im Mund bezüglich der entstehenden Partikelgrößen relativ gut nachempfunden. Die Versuche zeigen, dass das verwendete Kartoffelmaterial bei gleicher Einwaage sowohl im frischen als auch im lyophilisierten Zustand circa 2 – 4 mal so viel Protein freisetzt wie die Tabakproben. Dieses Ergebnis deutet auf einen allgemein höheren Proteingehalt in den Kartoffelknollen hin und wird durch Angaben in der Literatur bestätigt. Danach enthalten frisch geerntete Kartoffelknollen etwa 76 % Wasser, ca. 2,2 % Eiweiß und ca. 12 – 18 % Stärke. Die Blätter des Tabaks bestehen dagegen zu 85 % aus Wasser und zu ca. 1,5 % aus Eiweiß (Geisler, 1991). Substanzverluste bei den Kartoffelknollen, die während der Lagerung auftreten, werden vorwiegend durch Wasserverdunstung verursacht. Im Durchschnitt wird mit Verdunstungsverlusten von 0,8 – 1,0 % pro Monat gerechnet (Entrup und Oehmichen, 2000). Die in den Freisetzungsversuchen als Frischmaterial verwendeten Kartoffelknollen waren zum Versuchszeitpunkt bereits 9 Monate gelagert, so dass von einem lagerungsbedingten Wasserverlust von etwa 10 % ausgegangen werden kann. Neben dem Wasserverlust traten in den Knollen durch Atmungsprozesse stoffliche Umwandlungsprozesse auf. Hierbei wird Stärke zu Zucker abgebaut und der Proteinanteil nimmt ab.

Eine weitere Begründung der unterschiedlichen Proteingehalte liegt in den unterschiedlichen Gewebestrukturen von Knollen und Blättern. Das Tabakblattgewebe besitzt einen schichten-

förmigen Aufbau und bildet an den Blattunter- und Oberseiten eine schützende Epidermis mit Kutikula aus. Diese Barriere verzögert die Wassereinlagerung und erschwert deshalb das Herauslösen von Makromolekülen (z.B. Proteinen) aus dem Zellverbund. Darüber hinaus werden durch das Feinhäckseln nicht alle faserhaltigen Gewebeschichten mitsamt ihren Zellen beschädigt und es entstehen nur verhältnismäßig kleine Schnittflächen an den Blattstücken, d. h. die Blattstruktur bleibt im Großen und Ganzen erhalten. Hierdurch verbleibt ein gewisser Anteil an Eiweißmolekülen in den Zellen, insbesondere in den Vakuolen, ohne das ein Übertritt ins PBS stattfindet. Kartoffelknollen hingegen besitzen einen schwammartigen Gewebeaufbau ohne Faserstrukturen, aber mit vielen eingelagerten Stärkegranula. Aus diesem Grund wird das Gewebe der Kartoffelknolle beim Feinhäckseln stärker beschädigt und kann demnach auch mehr zelluläres Protein freisetzen. Dies würde, unabhängig von der Aufschlussart, den relativ großen Unterschied im erzielten Proteinfreisetzungslevel zwischen Tabak und Kartoffeln erklären.

Die Zeit, die bis zum Eintreten des Sättigungszeitpunktes (d.h. bis zur maximalen Proteinfreisetzung) verstreicht, ist sowohl innerhalb der einzelnen Pflanzenarten, als auch innerhalb der untersuchten Sorten nicht signifikant von der Aufschlussart abhängig. Es kann davon ausgegangen werden, dass alle Eiweißmoleküle, die innerhalb der 120-minütigen Zeitspanne nicht in Lösung gegangen sind, in den Zellen eingeschlossen sind. Im Gegensatz zum Tabak ist die Freisetzung beim Kartoffelmateriale nach kürzerer Zeit abgeschlossen, da Proteine aus einer granularen Gewebestruktur mit großer innerer Oberfläche schneller in Lösung übertreten. Der Vergleich der beiden Aufschlussarten innerhalb einer Pflanzenart (transgene und nahisogene Pflanzen zusammengefasst) zeigt hinsichtlich der Gesamtproteinfreisetzung signifikante Unterschiede im Niveau der erzielten Sättigungskonzentrationen. Danach setzt Kartoffellyophilisat im Durchschnitt 40 % mehr Protein frei als Kartoffelfrischmaterial. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass gehäckselter Kartoffelmateriale mit seiner granularen Gewebestruktur im Gefriertrocknungsprozess eine zusätzliche Gewebezersetzung erfährt. Obwohl das Lyophilisieren eine relativ schonende Konservierungsform ist, kann die rasche Abkühlung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die große Anzahl an Stärkepartikeln unterschiedlicher Größe (Durchmesser ca. 10 bis $100\text{ }\mu\text{m}$) zur Ausbildung einer sehr heterogenen Eiskristallstruktur führen (Maier, 2003). Das in diesem Fall entstehende Produkt ist ein sehr feinporiges Lyophilisat mit großer, innerer Oberfläche, das die Wassereinlagerung und das Herauslösen der Proteine erleichtert (List und Schmidt, 1984). Beim Tabak ist der gegenteilige Fall eingetreten. Das Frischmaterial setzt ca. 25 % mehr Protein als das Lyophilisat frei. Der signifikante Unterschied, der nicht der Erwartungshaltung entspricht, kann eventuell auf eine starke Gewebeschrumpfung infolge des Was-

serentzuges durch Sublimation zurückgeführt werden. Die gehäckselten Tabakblätter bestehen zu ca. 85 % aus Wasser und enthalten damit mehr Wasser als Kartoffelknollen (ca. 76 %). Sie könnten durch den Wasserentzug stärker geschrumpft sein als das Knollenmaterial und dadurch einen Teil ihrer Quellsfähigkeit bei späterer Rehydratation verloren haben. Ein bestimmter Anteil an Protein ist dann in den zellulären Strukturen festgelegt und kann in einer wässrigen Flüssigkeit (z. B. PBS) nicht herausgelöst werden. Diese Fraktion kann wahrscheinlich nur durch den Einsatz saurer oder alkalischer Lösungen aufgeschlossen werden.

Bei der Untersuchung des *in vitro* Abbaus von Proteinen aus intaktem Pflanzenmaterial wurden Proteine aus unterschiedlichen Pflanzen getestet. Der erste Schritt bestand in den Untersuchungen zur Proteinfreisetzung aus Kartoffelknollen und Tabakblättern. Diese weisen einen sehr unterschiedlichen Gehalt an Gesamtprotein auf. Die Freisetzung der Proteine aus gehäckselten Kartoffelknollen erfolgte deutlich schneller, als aus ebenfalls gehäckselten Tabakblättern. Ausgehend von der Annahme, dass nur die Proteine die in Lösung gehen auch durch Pepsin und Pankreatin gespalten werden können, wurde die Lösung zentrifugiert und der Überstand weiter getestet. Die Untersuchungen zum Abbau des enthaltenen Gesamtproteins zeigten eine Spaltung der Proteine innerhalb kurzer Zeit, wobei auch hier die Proteine aus der Kartoffel schneller gespalten wurden. Anschließend wurde die Verdauung der gentechnisch fremden Proteine CTB, VP 60 und GFP untersucht. Bereits nach wenigen Sekunden waren diese Proteine nicht mehr nachweisbar, was auf eine sofortige Spaltung der Fremdproteine durch Pepsin hinweist. Keines der untersuchten Proteine war nach einer Pepsineinwirkzeit von 30 min mehr nachweisbar. Anhand dieser Ergebnisse kann ein Übertritt dieser Substanzen durch die Magenwand ins Blut ausgeschlossen werden.

6.4.2 Proteinabbau in Pflanzenmaterial

Beim Einsatz von Pflanzenmaterial ist die Freisetzung der Proteine aus der Pflanzen in die wässrige Phase zu beachten. Die Versuche haben allerdings gezeigt, dass beim Kartoffelmaterial die Proteine innerhalb der jeweiligen Inkubationszeiten in Lösung gegangen sind. Beim Tabak-CTB erfolgte dieser Prozess zwar zeitlich verzögert, aber auch hier liegt der größte Teil des Proteins bereits nach einer halben Stunde in gelöster Form vor. Die angesetzte Zeit müsste demnach zum Herauslösen der Proteine, einschließlich des Fremdproteins, ausgereicht haben. Nur der nahisogene Tabak benötigt bis zu 50 Minuten, um seine maximale Proteinfreisetzung zu erreichen. Doch auch bei dieser recht stabilen zellulären Struktur reichen die in der *in vitro* Verdauung verwendeten Zeiten aus.

Um Abbauprozesse, wie sie nach Zugabe des Pepsins erfolgen, im ELISA erkennen zu können, muss zum Zeitpunkt der Pepsinzugabe schon ein gewisser Anteil an Fremdprotein in der Lösung vorliegen. Dies geschieht während der Inkubation mit Amylase. Die dadurch nötige α -Amylase Einwirkdauer von 30 Minuten kann weiterhin dadurch begründet werden, dass beim Schwein der pH-Wert im Magen nach Aufnahme einer vollen Mahlzeit zunächst im schwach sauren Bereich (pH 3 - 5) liegt. Erst nach einer ca. 30 minütigen Durchmischungsphase stellt sich im Chymus ein saures Milieu ein (pH 1 - 3). In der Gegend der Kardia kann α -Amylase Kohlenhydrate aufspalten, bis der pH-Wert in den sauren Bereich absinkt (Jeroch *et al.* 1999, Kolb 1989).

Die meisten Experimente zum Abbau von rekombinaten Proteinen beschränkten sich auf die Modellabschnitte Mund und Magen. Dagegen wurde auf die Simulation der Dünndarmverdauung verzichtet. Dieser Versuchsplanung lag die Annahme zu Grunde, dass der CTB-ELISA nur strukturell intakte CTB-Proteinuntereinheiten detektieren kann. Die verwendeten Antikörper lagern sich dabei an spezifische Antikörperbindungsstellen (Epitope) an, die in der Oberflächenstruktur der Proteine vorliegen. Im sauren Milieu des Magens (pH-Optimum: 1 - 3) verlieren Proteine dagegen ihre Tertiär- und Sekundärstruktur (Jeroch *et al.* 1999, Engelhardt und Breves, 2005). Darüber hinaus fördert die vorangehende Denaturierung die proteolytische Wirkung des Pepsins, das als Endopeptidase bevorzugt Bindungen innerhalb der Proteinmoleküle spaltet. Im Verdauungsversuch wurde dieser Zustand durch den Einsatz von Pepsin und Salzsäure, die mindestens 60 Minuten auf das Probenmaterial einwirkten, nachempfunden. In Abhängigkeit von der Versuchsdauer entstehen durch die Pepsineinwirkung Peptidfragmente unterschiedlicher Längen. Daher besteht die Möglichkeit, dass die eingesetzten Antikörper keine intakten Bindungsstellen finden und das Fremdprotein bzw. dessen Fragmente nicht mehr über ELISA-Technik detektiert werden kann. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wurde das Fremdprotein so weit abgebaut, dass es seine strukturellen und damit auch funktionellen Eigenschaften verloren hat. Demzufolge ist eine Simulation der Dünndarmverdauung nicht mehr notwendig.

Dies gilt allerdings nicht, wenn die Wirkung des entstehenden Peptidgemisches auf den Organismus untersucht werden soll. Denn durch die verschiedenen Proteasen in Dünndarm, die die entstehenden Oligopeptide nach der Pepsinspaltung weiter abbauen, entstehen neue, kleinere Peptide, die andere Wirkungen haben können.

6.4.3 Unterschiede im Proteinabbau von Fremdprotein und Gesamtprotein

HCl führt im Magen zu einer Quellung bzw. Denaturierung der Proteine, die dann durch Pepsineinwirkung abgebaut werden (Kolb, 1989). Im Ergebnis dieser Pepsineinwirkung entstehen Gemische von Polypeptiden unterschiedlicher Fragmentlängen, die über den Bradford-Nachweis quantitativ untersucht werden können. Auch nach Flachowsky (2007) sind Proteine auf Grund ihrer Struktur sehr labil gegenüber physikalischen und chemischen Behandlungen. So reicht beispielsweise schon die Erhitzung bei 60 C° aus, um die meisten Proteine irreversibel zu zerstören. Bei Wiederkäuern werden die Futterproteine zudem im Pansen weitgehend mikrobiell abgebaut. Die verbleibenden Proteine werden, wie bei Nichtwiederkäuern, enzymatisch im Dünndarm verdaut. Darüber hinaus fanden sich nach Flachowsky (2007) auch in der Literatur keine Hinweise, nach denen sich Fremdproteine anders verhalten als herkömmliche Futterproteine. Okunuki *et al.* (2001) haben den Einfluss von künstlichem Magensaft (SGF = simulated gastric fluid) mit 0,3 % Pepsin und HCl-Lösung (pH = 1,2) auf zwei unterschiedliche Fremdproteine, sowohl in auf gereinigter Form als auch gelöst im Pflanzenextrakt vorliegend, untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass CP4-EPSPS (47 kDa) und Cry1Ab (130 kDa) bei beiden Aufschlussarten nach höchstens 120 sec SGF-Einwirkung komplett verdaut waren, d. h. im Western-Blot nicht mehr nachgewiesen werden konnten. In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis des CTB-Fremdproteins mit dem ELISA, da dieser im Gegensatz zum Western-Blot sensitiver ist. Die eigenen Untersuchungen zeigen bezüglich des CTB-Abbauverhaltens zwar eine ähnliche Tendenz, die Verdauungszeiten sind aber zum Teil wesentlich länger. Dies kann auf die anderen Materialeigenschaften der verwendeten Pflanzen und die höheren Konzentration an Protein (CTB) zurückgeführt werden. Bei den eigenen Untersuchungen wurde im Gegensatz zu Okunuki *et al.* (2001) kein Extrakt, sondern direkt Pflanzenmaterial eingesetzt. Andererseits war in den eigenen Versuchen die Pepsinkonzentration (0,1 %) geringer und der pH-Wert mit ca. 2 höher. So zeigten die Verdauungsversuche mit Kartoffellyophilisat, bei dem die Proteine schneller freigesetzt werden, dass schon nach einer Einwirkdauer von 30 Minuten kein Fremdprotein mehr detektiert werden kann. Dagegen kann CTB bei Verdau von Frischmaterial über die gesamte Versuchsdauer (90 min) in den Proben nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser geringen CTB-Mengen kann eventuell darauf zurückgeführt werden, das Protein und damit auch Fremdprotein, dass zu Versuchsbeginn noch in intakten Zellen eingeschlossen war, sich erst mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung, nach Auflösung der Mittellamelle und Plasmamembranen (Chapbell, 2000), aus dem Zellverbund herausgelöst hat. Das könnte zu einer geringen Freisetzung an neuem Fremdprotein im Verlauf der Verdauungssimulation geführt haben. Wobei hier, mit

Blick auf den Fremdproteinabbau bei Lyophilisat, davon ausgegangen werden kann, das gelöste CTB durch Pepsin relativ schnell (innerhalb von 30 min) abgebaut wird. Hagemann *et al.* (2006) konnte eine erhöhte Antikörperstabilität bei Verfütterung von grob anstelle von fein gemahlenem Erbsenmaterial feststellen. Der CTB- Abbau zeigte beim Tabaklyophilisat eine ähnliche Tendenz wie beim Kartoffellyophilisat, mit dem Unterschied, dass die Nachweisgrenze beim Tabaklyophilisat erst später erreicht wurde (60 min). Der insgesamt zügige CTB- Abbau bei Einsatz von lyophilisiertem Material kann auf die guten Lösungseigenschaften (Maier, 2003), verbunden mit einer zügigen Proteinfreisetzung, zurückgeführt werden.

Lyophilisierte Kartoffelproben setzen im Vergleich zum Frischmaterial signifikant höhere Mengen an Gesamtprotein frei. Dieses Ergebnis wird auch durch die Anfangswerte (P0), die zu Beginn der *in vitro* Verdauungssimulation ermittelt wurden, bestätigt (Abb. 14 und 16). Entgegen der Annahme, dass das Fremdprotein die gleiche Freisetzungstendenz wie das Gesamtprotein aufweist und auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Verdünnungseffekte durch Zugabe von Pepsin/HCl-Lösung, zeigen die P0-Werte beim Lyophilisat geringere CTB-Konzentrationen als beim Frischmaterial. Eine mögliche Erklärung kann die Schädigung des CTB durch den Gefriertrocknungsprozess oder insgesamt niedrigere CTB-Gehalte im Pflanzenmaterial sein. Wobei nach Pikal (1992) Proteine im lyophilisiertem Zustand wesentlich länger stabil bleiben als bei Aufbewahrung in Lösungen oder im frischen Zustand (bei pflanzlichen bzw. tierischen Proben).

Durch die Verwendung eines spezifisch gegen die CTB-Proteinuntereinheit gerichteten Beschichtungsantikörpers ist der qualitative und quantitative Nachweis des zu untersuchenden Fremdproteins mit dem ELISA sicher. Probleme, die bei der Beschichtung der Mikrottestplatten auftreten können, führen zu ungenauen Extinktionswerten und Konzentrationsangaben. In der Regel sind fehlerhafte Beschichtungen an der Eichreihe durch den ausbleibenden Farbumschlag zu erkennen. Die Verdünnung der Proben wurde, ermittelt in Voruntersuchungen, so gewählt, dass die CTB-Konzentrationen im linearen Bereich der berechneten Regressionsgeraden lagen. Die Anlagerung der Antikörper erfordert einen neutralen pH-Wert in den aufzutragenden Verdauungsproben. Zur Einhaltung dieses optimalen Bereiches wurde die Zugabe von alkalisch wirkender TRIS-Lösung zur Probe von zunächst 100 µl auf 20 µl heruntergesetzt.

Der zur Gesamtproteinbestimmung nach Bradford (1976) verwendete Nachweis gilt als Standardmethode. Es muss jedoch beachtet werden, dass der Coomassie-Brilliant G-250 Farbstoff hauptsächlich an aromatische Aminosäuren bindet. Aus diesem Grund können Lösungen trotz

gleicher Proteinkonzentration, aber differenzierter Proteinzusammensetzung, unterschiedliche Extinktionen verursachen.

6.4.4 Proteinabbau (NPTII) im Tierversuch

(Andre Kacholdt)

Im Tierversuch wurden die Tiere mit NPTII enthaltenden Kartoffeln gefüttert. Dabei geschieht der Abbau von NPT II durch Pepsin im Magen vollständig, weshalb NPTII im Magensaft von Schweinen nach erfolgter Fütterung nicht nachgewiesen werden kann. Diese Ergebnisse stimmen mit sowohl mit den eigenen und den *in vitro* Untersuchungen von Fuchs *et al.* (1993) überein. Während der *in vitro* Verdauung von NPTII ist dieses wenige Sekunden nach Pepsinzugabe nicht mehr nachweisbar. Fuchs arbeitete nicht mit Pflanzenmaterial, sondern mit dem reinen Protein. Er konnte zeigen, das reines NPT II 10 Sek. nach Pepsinzugabe nicht mehr detektierbar ist. Nach dem Magen steigt der pH-Wert von 2,0 auf 6,8 im Dünndarm an. Das pH-Optimum für Pepsin liegt aber bei 2,0 (Schlamowitz und Peterson, 1959). Aus diesem Grund wird es durch den höheren pH-Wert im Zwölffingerdarm irreversibel inaktiviert.

Bei der Analyse der Inhalte der verschiedenen Abschnitte des Dünndarms konnte überraschenderweise rekombinantes NPT II nachgewiesen werden. Die höchsten Konzentrationen waren im Duodenum messbar. Hier wäre theoretisch auch eine Aufnahme von intakten Proteinen in den Organismus denkbar. Im weiteren Verlauf des Dünndarms nahm die Konzentration ab. Im Magen war kein Nachweis möglich. Somit ergeben sich Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Verdauung. Grund hierfür ist die Deaktivierung des Pepsins durch den pH-Anstieg, verursacht durch die Abgabe von carbonathaltigen Puffern aus dem Pankreas. Die pflanzlichen Zellen haben die Proteine in ihrem Inneren vor Angriffen von Proteasen geschützt.

Dieses geschützte NPTII kann durch einen feineren Aufschluss gelöst und nachgewiesen werden. Dazu wurde der Mageninhalt nach der Schlachtung entnommen, getrocknet und mit der Kugelmühle sehr fein gemahlen. Anschließend konnte intaktes NPTII aus dem Magenrückstand nachgewiesen werden. Wie gezeigt, ist das Futter durch die Wirkung der Salzsäure stark aufgeschlossen, wodurch es zur Freisetzung von Inhaltsstoffen kommt. Die Proteasen des Pankreas brauchen (Nachweis *in vitro* Fuchs *et al.* 1993) zum Abbau von Proteinen wesentlich länger als Pepsin. Dadurch liegen für einen gewissen Zeitraum (ca. 0,5 – 1h) intakte Proteine im Duodenum vor und können immunologisch nachgewiesen werden und auch in den Organismus aufgenommen werden. Die Proteine werden im Verlaufe der Passage des

Dünndarmes abgebaut und im Ileum ist dieser Abbau bereits vollständig erfolgt. Im Ileum und Kot ist somit beim Schwein kein Nachweis von rekombinaten NPTII aus Kartoffeln mehr möglich. Auch in anderen Arbeiten konnte ein völliger Abbau der rekombinanten Proteine (Bt-Toxin) nachgewiesen werden (Einspanier *et al.* 2004).

Dem Vorliegen von intakten Proteinen im Duodenum der Versuchstiere des Tierversuchs als Folge der unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten von Pepsin und den pankreatischen Proteasen muss durch ein spezielles Versuchsdesign Rechnung getragen werden.

Da beim Abbau der Proteine durch die Bauchspeicheldrüsenenzyme andere Fragmente entstehen können als wenn die Polypeptide des Pepsinabbaus weiter abgebaut werden, ist eine *in vitro* Verdauung der Ausgangsstoffe durch Pankreatin nötig, ohne dabei vorher mit Pepsin zu inkubieren. Nur so kann der Abbau von den Proteinen simuliert werden, die *in vivo* intakt im Duodenum vorliegen. Eventuell auftretende Peptide mit allergenen Eigenschaften, die durch den Abbau der Proteine durch die Pankreasproteasen entstehen, können so auch *in vitro* entstehen und in geeigneten Tests auf ihre Wirkungen untersucht werden.

Es sind zwei Versuchsprofile notwendig, um die beiden verschiedenen Abbauprozesse zu simulieren. Im ersten sollte der Abbau komplett simuliert werden, von der Amylase bis hin zum Pankreatin. Dieser Ansatz simuliert die ganz normale Verdauung. Des Weiteren muss aber aufgrund der Untersuchungsergebnisse aus dem Tierversuch der Abbau von intakten Proteinen nur durch die Proteasen des Pankreas untersucht werden. Das ist nur durch einen Ansatz möglich, auf den vorher noch kein Pepsin eingewirkt hat. Die dabei entstehenden Abbauprodukte können sich durchaus von denen aus dem Abbau mit Pepsin und anschließender Einwirkung von pankreatischen Enzymen unterscheiden. Deshalb müssen sie in einem zweiten Ansatz extra hergestellt werden. Nur so können die verschiedenen Peptide entstehen, die auch bei der *in vivo* Verdauung entstehen und in den entsprechenden Verfahren auf ihre allergenen und toxischen Wirkungen untersucht werden.

Ein weiterer unerwarteter Effekt ist der erfolgte Nachweis von NPT II im Verdauungstrakt von Schweinen, die mit nahisogenen Kartoffeln gefüttert wurden, auch hier konnte im Magen kein Fremdprotein nachgewiesen werden, erst im Zwölffingerdarm zeigten sich detektierbare Mengen von NPT II. Der vermutet Grund für dieses Ergebnis liegt im ubiquitären Vorkommen von NPT II in der Umwelt.

Während des Tierversuches wurde die Gewichtsentwicklung der Schweine beobachtet und es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsvarianten 1. transgene und 2. isogene Kartoffelfütterung. Diese Ergebnisse zeigten sich auch in Untersuchungen von Chesson und Flachowsky (2002), die nachgewiesen haben, dass eine Fütterung

mit transgenem Pflanzenmaterial keinen signifikanten Einfluss auf das Gewicht der Tiere hatte. Ein zusätzlicher Untersuchungsparameter war das Blutbild der Tiere. Die Daten zeigen einen signifikanten Unterschied bei fünf Blutparametern zwischen den Tieren, die die isogenen Kartoffeln erhielten, und denen die die transgenen Kartoffellinien mit NPT II erhielten.

6.5 Resorption

(Mandy Bruch)

Als Untersuchungsmethode zur Simulation der Resorption wurde das Ussing-Kammersystem gewählt. Die Ussing-Kammer ist eine elektrophysiologische Apparatur, in der Epithelien über einige Stunden kultiviert werden, um Barriere- und Transportfunktionen des lebenden Gewebes studieren zu können. Sie geht auf die Arbeiten von Ussing und Zehran zurück, die 1951 die Erstbeschreibung von Na^+ -Fluxmessungen parallel zu Na^+ -basierten Strommessungen veröffentlichten. Später folgte in anderen Arbeiten das Konzept des Short Circuit sowie Fehlerabschätzungen zu den Versuchsergebnissen (Scheffler, 1984). Einen Einfluss auf die Messungen und die Messgenauigkeit haben die elektrischen Eigenschaften der Kammern, die elektrophysiologischen Parameter und die Kennlinieneigenschaften der Gewebe und der Potenzialverlauf entlang der Messstrecke. Bei jeder Messung werden neben dem durch das Präparat verursachten Spannungsabfall auch der längs der verbleibenden Flüssigkeit, sowie das Eigenpotenzial der Elektroden mit erfasst (Scheffler, 1984). Daraus folgt die Notwendigkeit von Leermessungen vor dem Einbau des Epithels, deren Werte bei den späteren Messungen durch die Messanlage automatisch abgezogen werden. Diese Methode erlaubt, Transportvorgänge am isolierten Gewebe durchzuführen. Das Epithel kann in der Ussing-Kammer als „Blackbox“ betrachtet werden (Civan, 1983). Aber in den letzten Jahrzehnten wurden viele Erkenntnisse über die Transportmechanismen von Epithelien gewonnen weshalb die ‘Blackbox’ ‘Epithel’ keine echte Blackbox mehr ist und die Messergebnisse aus der Ussing-Kammer sicher als einzeln angesprochene Mechanismen interpretierbar sind. Diese Messungen in der Ussing-Kammer, also unter künstlichen Bedingungen, lassen in vielen Fällen qualitative Rückschlüsse auf die Verhältnisse am Epithel *in vivo* zu (Schultheis, 1995). Auch der Transport von anderen geladenen Molekülen (Aminosäuren, Peptiden) kann bestimmt werden (Neumann *et al.* 2004). Bei Untersuchungen von nichtelektrogenen Transporten, dazu zählen Transporte von Proteinen, wird die Protein-Puffer-Lösung auf der simulierten mukosalen Seite des Gewebes zugegeben. In definierten Zeitabständen werden Proben aus dem serosalen Kompartiment entnommen, in denen der zu untersuchende Stoff nachgewiesen wird. Bei Proteinen bieten sich immunologische Bestimmungsmethoden an, da diese einen spezifischen

Nachweis erlauben. Die *in vitro* Resorptionsuntersuchungen wurden am nativen Darmepithel von Schweinen durchgeführt. Das Schwein als Modelltier wurde bevorzugt, da der Aufbau des Verdauungstraktes dem des Menschen sehr ähnlich ist und sowohl Mensch als auch Schwein zu den Monogastriern gehören. Die Ussing-Kammer als Untersuchungsmethode wurde bisher für die Charakterisierung von elektrogenen Transporten durch verschiedene Gewebe genutzt (Lodemann et al. 2006). In dieser Arbeit sollte der nichtelektrogene Transport von Proteinen durch das Dünndarmepithel simuliert werden. Dazu wurde das frische Epithel mit Carbogen begast und bei 37°C am Leben gehalten. Erste Untersuchungen mit ^3H -Mannitol zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Diffusion von Mannitol von der Beschaffenheit des Gewebes. Je dünnere Schichten das Gewebe aufweist, desto höher ist die gemessene Diffusion. Anhand der Ergebnisse zum Transport von [^3H]-Mannitol ist es wichtig, die Muskelschicht vom Epithel zu entfernen. Obwohl das Handling, bestehend aus Entnahme, Präparation, Proben-transport und Einbau der Epithelien in die Ussing-Kammer mit größtmöglicher Sorgfalt erfolgte, war eine geringfügige Schädigung des Epithels in Ausnahmefällen mit möglichen Auswirkungen auf die Transport- oder Barriereigenschaften durch die Manipulationen nicht unbedingt auszuschließen. Anhand der Ausschlusskriterien, denen Erfahrungswerte zugrunde lagen, wurden geschädigte Epithelien jedoch nicht in die Versuchsauswertung einbezogen und die Versuche auf diese Weise standardisiert. Aber mit noch vorhandener Muskelschicht am Gewebe würde der Transport in den Bauchraum und nicht in die Blutbahn gezeigt werden. Weiterer Vorteil ist ein höherer Transport, weshalb auch Transporte nachgewiesen werden können, die ohne die Entfernung der Muskelschicht nicht erfassbar wären. Allerdings ist zu beobachten, dass durch die mechanische Beanspruchung beim Entfernen der Muscularis das Gewebe empfindlicher wird. Die Anfangswiderstände sind niedriger und im Verlaufe des Versuches sinken die Widerstände schneller. Eine wichtige Voraussetzung für derartige Untersuchungen ist die gewährleistete Funktionalität des verwendeten Gewebes. Als ein erster Hinweis auf die Intaktheit des Gewebes, vor allem schon während des Versuches, kann der Widerstand des Gewebes ständig verfolgt werden. Ein alleiniger Rückschluss vom Widerstandswert auf den Zustand des Gewebes ist aber zu unsicher. Deshalb wird nach Versuchende der Strom zwischen den Halbkammern konstant eingestellt. Werden durch Ionenkanalblocker (Theophyllin) physiologische, elektrogene Transporte inhibiert, so kommt es dadurch zu einer charakteristischen Änderung des Stromes. Theophyllin erhöht die Ionensekretion, dabei hauptsächlich die Cl^- Sekretion (Bakker und Groot, 1984), stark, wodurch der Kurzschlussstrom I_{sc} rapide ansteigt. Dies geschieht nur bei lebendem, funktionstüchtigem Epithel, weshalb ein Ansteigen des I_{sc} in den ersten 10 min als Beweis der

Vitalität des Epithels zum Zeitpunkt der Messung angesehen wurde (Argenzio *et al.* 1984, Mc Ewan *et al.* 1990; Schroeder *et al.* 2004). Daraus kann auf eine noch vorhandene physiologische Intaktheit des Gewebes geschlossen werden.

Die lange Versuchsdauer von 6 h wurde gewählt, da der Transport von Proteinen langsam erfolgt und es sichergestellt sein sollte, dass auf der serosalen Seite auch Proteine in nachweisbarer Menge vorliegen. 6 h ist die maximale Zeitspanne, bis zu der mit verwertbarer Wiederholungszahl eine Gewebefunktionalität gewährleistet werden konnte. Allerdings erlauben weder der Widerstandswert noch die Stromänderung einen Rückschluss auf den tatsächlichen Zustand des Darmepithels. Deshalb war es notwendig histologische Untersuchungen durchzuführen. Die Schnitte wurden sowohl mit Hämatoxilin / Eosin und mit Antikörpern behandelt und die Ergebnisse zeigen eine starke Veränderung des Gewebes bereits nach 3h Versuchsdauer in der Ussing-Kammer. Die Gewebestrukturen lösen sich auf, es ist keine genau umrissene Struktur mehr zu erkennen und einzelne Partikel lösen sich vom Zellverband ab. Daher ist eine Versuchsdauer über 3 h hinaus äußerst fraglich, da nicht gewährleistet werden kann, dass die für Transportprozesse notwendigen Zellstrukturen noch funktionsfähig erhalten sind. Dagegen spricht die Tatsache, dass das Gewebe auch noch nach 6 h Versuchsdauer eine eindeutige Stromantwort lieferte, die allgemein üblich (Wolffram *et al.* 2010) auf noch lebendes Gewebe hindeutet. Genauere Untersuchungen zu diesen Fragestellungen sind empfehlenswert.

6.5.1 Resorption von GFP

Da das Protein GFP mittels Antikörper einfach nachzuweisen ist, und der Transport aus früheren Arbeiten bekannt war (Kacholdt und Bruch unveröffentlicht), wurde es als Modellprotein ausgewählt. GFP konnte nach 6 h Versuchsdauer auf der serosalen Seite des Gewebes nachgewiesen werden und der Transport zeigte eine deutliche Konzentrations- und Zeitabhängigkeit. Die Transportrate von GFP ist aber abhängig vom verwendeten Segment des Dünndarmes. Der Transport / $6 \text{ h} \cdot \text{cm}^2$ ist am Jejunum und Ileum signifikant höher im Vergleich zum Duodenum. Aufgrund dieser Ergebnisse und der genaueren Möglichkeit der anatomischen Abgrenzung des Ileums im Vergleich zum Jejunum, wurden die anschließenden Ussing-Kammerversuche zum Transport der transgencodierten Proteine am Ileum durchgeführt.

Ein weiterer Aspekt der mit dem Protein GFP untersucht wurde, ist der Transportmechanismus am Darm. Proteine können über zwei grundlegende Vorgänge erfolgen: Diffusion oder aktiver Transport. Um die Transportvorgänge näher charakterisieren zu können, wurde das GFP aus Tabak in Verbindung mit Cholchicin und Cytochalasin D (Inhibitoren des Cytoske-

letts) in die Ussing-Kammer gegeben. Im Vergleich zur Kontrolle wurde der Transport von GFP durch den Einsatz von Cholchicin und Cytochalasin D partiell gehemmt (Tab.3) Die Diffusionseigenschaften des Epithels wurden durch diese Substanzen nicht beeinflusst, wie die Untersuchungen mit [^3H]-Mannitol zeigen. Daher sind aktive Transportmechanismen unter Beteiligung des Zytoskelettes anzunehmen.

Es folgten weitere Arbeiten zur Klärung der Transportmechanismen für GFP. So wurde sowohl die reine Temperaturabhängigkeit als auch die Wirkung von Temperatur und Cholchicin untersucht. Ein weiterer Aspekt ist die Annahme, dass aktiver Transport vor allem an den M-Zellen der Payerschen Platten am terminalen Ileum vorkommen soll. Daher wurde gleichzeitig der Transport an Epithelstücken mit Payerschen Platten (PP) und ohne (ohne PP) untersucht.

Im Gegensatz zu den in der Literatur getroffenen Angaben weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der Transport insbesondere in den Ileumregionen ohne Payersche Platten stattzufinden scheint. Die Hemmwirkung niedrigerer Temperatur auf einen aktiven Transportprozess konnte nicht gezeigt werden. Für eine Klärung der Lokalisation von GFP sind auch hier ergänzende Untersuchungen z. B. mit immunohistologischen Methoden, notwendig.

Aufgrund der Annahme, dass GFP möglicherweise über ABC-Transporter durch das Dünndarmepithel transportiert wird, schlossen sich weitere Untersuchungen an. Der Transport von GFP unter dem Einfluss von Glibenglamid, einem Hemmer des ABC-Transportsystems wurde untersucht. Nach Literaturangaben sind die ABC-Transporter zwar auf der basolateralen Seite des Epithels lokalisiert, allerdings zeigte sich bei den eigenen Versuche auch einen Transport in umgekehrter Richtung.

GFP wurde in beide Richtungen bei höheren serosal nach mucosal ($\text{S} \rightarrow \text{M}$) Fluxen, durch das intestinale Epithel transportiert. Dieser ($\text{S} \rightarrow \text{M}$) Transport von GFP wurde von Glibenglamid über 50 % inhibiert. Der Effekt war abhängig vom verwendeten Gewebe, mit oder ohne Payersche Platten. Eine mucosale Zugabe von Glibenglamid führte zu einem steigenden Flux von GFP am Gewebe ohne PP, aber es gab keinen Effekt an den Payerschen Platten. Der stärkere Effekt bei Zugabe zur serosalen Seite weist auf das Vorhandensein von ABC-Transporten in der basolateralen Membran hin.

Allerdings führt Glibenglamid auch zu einem höheren mucosal nach serosalen Transport, wenn es zur mucosalen Seite zugegeben wird. Eine mögliche Erklärung liegt in der Annahme das Glibenglamid erst auf die serosale Seite transportiert wird und dort den serosal nach mucosal Transport reduziert. Das bedingt möglicherweise einen scheinbar höheren mucosal nach serosal Transport. Diese Aussage wird durch die Tatsache unterstützt, dass dieser Effekt nur

an Geweben ohne Payersche Platten nachweisbar ist. Diese Ergebnisse in Verbindung mit der unvollständigen Hemmung des GFP Transportes durch Glibenglamid weisen auf die Existenz von weiteren Mechanismen für den GFP Transport hin.

6.5.2 Resorption der Modellproteine CTB, VP 60 und NPT II

Zum Transport der weiterhin eingesetzten Modellproteine sind folgende Aussagen zu treffen: Die Ergebnisse weisen auf einen sehr geringen, jedoch detektierbaren Transport der transgen-kodierten Proteine GFP und VP 60 durch das Dünndarmepithel hin. In den ersten Untersuchungen zeigte sich jedoch zusätzlich, dass das zum Vergleich verwendete isogene Pflanzenmaterial in den Proteinanalysen für NPTII, VP60 und CTB zu Hintergrundsignalen mit einem sehr hohen Schwankungsbereich führte. Aus diesem Grund wurden die ermittelten Transportraten mit einer erhöhten Anzahl an Kontrollproben (Wildtyppflanze), die den Proben des transgenkodierten Pflanzenmaterials entsprechen, durchgeführt. Anhand dieser Kontrollproben sollte der Schwankungsbereich für das Signal im ELISA bestimmt werden, den das isogene Pflanzenmaterial verursacht. Dieser Wert wurde als Blindwert mit den ELISA-Werten des transgenen Materials verrechnet.

Bei NPT II und CTB sinkt die Konzentration in der mucosalen Seite nach 6 Stunden Versuch, es ist jedoch kein Transport zu serosalen Seite detektierbar. Einerseits können die Proteine durch Proteasen der Darmzellen während des Versuches abgebaut werden oder sie binden an der Darmsurface bzw. werden in die Darmzellen transportiert. Damit kann von keinem Transport ins Blut ausgegangen werden und das Risiko diese Fremdproteine im Blut zu finden ist verschwindend gering.

7. Zusammenfassung

Um ein quantifizierbares Verfahren zur Detektion von Wechselwirkungen der gentechnisch veränderten Proteine mit dem Darmepithel und der Resorption aller durch die Expression des Fremdgens veränderten Stoffe und deren Auswirkungen auf den Organismus zu entwickeln, bedarf es einer strukturierten Vorgehensweise. Es sollte ein Verfahren entwickelt werden, das die in vitro Messung von ansonsten nur im Tierversuch zu erhebenden Daten über Verdauungs- und Resorptionsvorgänge im Darm gestattet.

Aus den bereits im Kapitel 2 beschriebenen Gründen wurde als Versuchstier das Schwein genutzt. Alle notwendigen Verdauungsvorgänge, die im Gastrointestinaltrakt des Schweines ablaufen, wurden analysiert und an Jungsauenaufzuchtfutter in vitro nachempfunden. Die Einflüsse der einzelnen Pufferlösungen, Enzyme und die für deren Wirkungsweise nötigen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Einwirkdauer) wurden entsprechend angepasst. Die Wirkungsweise der Hauptverdauungsenzyme (α -Amylase, Pepsin und Pankreatin/Gallenextrakt) konnte sowohl einzeln, als auch im Gesamtvorgang der in vitro Verdauung untersucht werden. Jedes der zugefügten Enzyme wirkt in seiner spezifischen Weise auf das Futtermittel ein und baut die jeweiligen Bestandteile ab. Diese spezifischen Wirkungsweisen wurden sowohl mit gravimetrischen Methoden, als auch immunologischen Methoden nachgewiesen.

Anhand der dabei gewonnenen Daten zu den Verdauungsenzymen und dem Abbaugrad des Futtermittels wurde eine in vitro Verdauungsmethode entwickelt. Diese Methode besteht aus drei aufeinanderfolgenden Verdauungsschritten, beginnend bei der Simulation der Stärkeverdauung in der Maulhöhle durch Inkubation des Futtermittels mit α -Amylase, gelöst in Puffer. Der folgende Schritt ist die Inkubation mit Pepsin, gelöst in HCl (pH-Wert 2,0) für einen Zeitraum von 3 h. Als letzter Schritt folgt die Zugabe von Pankreatin / Gallenextrakt – Lösung (pH-Wert 6,8) für einen Zeitraum von 2 h. Danach wird der Verdauungsansatz zentrifugiert und sowohl der Feststoff, als auch der flüssige Überstand analysiert.

Der Abbaugrad der natürlichen Verdauung kann unter in vitro Bedingungen nicht erreicht werden, z.B. erfolgt der Abbau von Proteinen während der Verdauung erst, nachdem das Protein durch die Magensäure und die Verdauungsenzyme aus den es umgebenden Pflanzenteilen freigesetzt wurde. Dieser Vorgang kann in vitro nicht in gleichem Maße erfolgen, aber es ist möglich, genügend Protein auch während einer in vitro Verdauung freizusetzen, um einen Abbaus zu gewährleisten und diesen auch nachzuweisen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass mittels in vitro Verfahren aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten sind.

Die gentechnisch veränderten Modellpflanzen wurden anhand der entwickelten in vitro Methode verdaut und es zeigte sich ein fast vollständiger Abbau dieser Proteine. Allerdings ist der Abbau der Proteine durch die Verdauungsenzyme vom jeweiligen Protein abhängig. Der Großteil der Proteine wird binnen weniger Minuten abgebaut, und ist schon nach einigen Sekunden nicht mehr immunologisch nachweisbar. Allerdings gibt es auch Proteine, die dem Abbau länger widerstehen, und bei denen es Sequenzen gibt, die gar nicht abgebaut werden können. In diesem Fall ist das eine spezielle Eigenschaft des Proteins, und es wäre dabei egal, ob es natürlich oder rekombinant in einer Pflanze vorkommt. Der Abbau rekombinanter Proteine unterscheidet sich nicht von dem Abbau der natürlichen Pflanzenproteine. Wesentlich mehr Einfluss auf den Abbau hat die Freisetzung der Proteine aus dem Pflanzenmaterial, da nur freigesetzte Proteine dem Zugriff der Verdauungsenzyme unterliegen. Die Freisetzung wird durch den Abbaugrad der Pflanze bzw. des Futtermittels bestimmt. Er ist in vitro ausreichend, um für die Analysen genügend Protein freisetzen zu können.

Bei der Verifizierung der in vitro Ergebnisse im Tierversuch, bei dem gentechnisch veränderte Kartoffeln als Futtermittel dienten, ergaben sich überraschend hohe Konzentrationen an rekombinantem Protein in Duodenum. Grund hierfür ist die Erhöhung des pH-Wertes durch die Sekretion von Hydrogencarbonat durch die Bauchspeicheldrüse. Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung von Pepsin, so dass die freigesetzten Proteine nicht abgebaut werden können. Der Abbau durch die ebenfalls sezernierten pankreatischen Verdauungsenzyme verläuft wesentlich langsamer als der durch Pepsin, so dass es zur Anreicherung von intaktem Protein kommt. Das sollte auch für nicht rekombinante Proteine zutreffend sein.

Durch das Vorkommen von intakten Proteinen im Duodenum muss für eine Risikobewertung, die für alle beim Proteinabbau entstehenden Peptide auch deren Allergenität berücksichtigen soll, ein entsprechendes Versuchsdesign entwickelt werden. Um alle möglichen Peptidbruchstücke abzubilden ist ein kompletter Verdau mit den Verdauungsenzymen des Magen und des Pankreases zu simulieren. Im in vitro System muss deshalb neben einer Verdauung mit α -Amylase, Pepsin und Pankraetin/ Gallenextrakt ein zweiter Versuchsansatz durchgeführt werden. In diesem befinden sich nur die Verdauungsenzyme aus dem Pankreas. Dieser Schritt entspricht der Freisetzung im Duodenum, wo intakte Proteine vorliegen und durch die Pankreasenzyme abgebaut werden. Dabei können durch unterschiedliche Schnittsequenzen der Proteasen andere Peptide mit anderem allergenem Potential entstehen, als durch die Spaltung mit Pepsin. Auch ein Prozess komplett ohne Verdauungsproteine wird benötigt, um das allergene Potential der im Duodenum vorliegenden Proteine darzustellen. Die aus jedem Ansatz gewonnenen Überstände müssen anschließend auf Allergenität untersucht werden. Dort even-

tuell nachgewiesene allergene Wirkungen würden auf ein potentielles Risiko der Pflanze hinweisen, welches aber, wie die Freisetzung der Proteine im Duodenum, nicht zu verhindern ist. Anhand dieser Ergebnisse können aus dieser Arbeit wichtige Rückschlüsse für den Abbau von Ganzpflanzen bei der Verdauung im Tier als auch in vitro gezogen werden.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit sollte die Resorption von intakten Proteinen und Proteinfragmenten charakterisiert werden. Die Methode der Wahl war die Ussing-Kammer-Technik, mit der die Resorption am nativen Darmepithel vom Schwein untersucht wurde.

Diese Technik eignet sich prinzipiell für Resorptionsstudien am nativen Epithel, aber ein Problem ist die Lebensfähigkeit des Gewebes bzw. deren Nachweisbarkeit. Ein eindeutiger Nachweis mit Theophyllin, ohne eine sich anschließende histologische Untersuchung des Gewebes ist nicht ausreichend, um die Vitalität zu gewährleisten.

Für die untersuchten gentechnisch veränderten Modellproteine konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden. Ein Transport der intakten Proteine GFP und VP 60 von der mukosalen zur serosalen Seite durch das native Darmepithel wurde nachgewiesen. Die Transportraten sind sehr gering, aber prinzipiell ist ein Übertritt dieser Proteine ins Blut möglich. Die Untersuchungen zur Resorption von bereits verdauten Modellpflanzen zeigten keinen Übertritt von Fremdproteinfragmenten auf die serosale Seite des Gewebes. Wobei hier auch berücksichtigt werden muss, dass die Konzentration eventuell unter der Nachweisgrenze lagen, oder aufgrund nicht geeigneter Antikörper nicht detektierbar waren. Abschließend ist hinsichtlich des Risikos der hier untersuchten Modellproteine von einem nur geringen Gefahrenpotential auszugehen. Die Fremdproteine wurden durch die in vitro Verdauung ebenso schnell abgebaut wie jedes andere Protein auch und selbst wenn das nicht der Fall ist, ist die Resorption ist verschwindend gering. Um aber das Allergenitäts- bzw. Toxizitätsrisiko der gentechnisch veränderten Pflanzen abschließend beurteilen zu können, sind weitergehende Untersuchungen nötig.

8. Literaturverzeichnis

Abrahamson DR., Rodewald R. (1981): *Evidence for the sorting of endocytic vesicle contents during the receptor-mediated transport of IgG across the newborn rat intestine.* Journal of Cell Biology, Vol. 91(1), S. 270-280

Ait-Oukhatar N., Bouhallab S., Bureau F., Arhan P., Maubois JL., Bougle DL. (2000): *In vitro digestion of caseinophosphopeptide-iron complex.* Journal of Dairy Research, Vol. 1, S. 25-29

Almaas H., Holm H., Langsrud T., Flengsrud R., Vegarud GE. (2006): *In vitro studies of the digestion of caprine whey proteins by human gastric and duodenal juice and the effects on selected microorganisms.* British Journal of Nutrition, Vol. 96(3), S. 562-569

Almela C., Laparra JM., Velez D., Barbera R., Farre R., Montoro R. (2005): *Arseno-sugars in raw and cooked edible seaweed: characterization and bioaccessibility.* Journal of Agricultural Food Chemistry, Vol. 53(18), S. 7344-7351

Anson B.J., Beaton LE., McDonald JJ. (1938): *The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin.* Journal of Genetic Physiology, Vol. 22, S. 79-89

Arakawa T., Chong D.K X., Merritt JL., Langridge WHR. (1997): *Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants.* Transgenic Research, Vol. 6, S. 403-413

Argenzio, R. A.; Liacos, J. A. (1990): *Endogenous prostanoids control ion transport across neonatal porcine ileum in vitro.* American Journal of Veterinary Research, Vol. 51, S. 747-51

Aumaitre, A., Aulrich, K., Chesson, A., Flachowsky, G., Piva, G. (2002): *New feeds from genetically modified plants: Substantial equivalence, nutritional equivalence, digestibility, and safety for animals and the food chain.* Livestock Production Science, Vol.74(3), S. 223-238

Autenrieth, I. B. (2003): *Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und patho-physiologische Aspekte.* Journal für Gastrointestinale Hämatologische Erkrankungen, Vol. 1(1), S. 14–17

Bakker, R.; Groot J. A. (1984): *cAMP-mediated effects of ouabain and theophylline on paracellular ion selectivity.* American Journal of Physiology, Vol. 246, G213-7

Bartsch D., Pohl-Orf M. (1996): *Ecological aspects of transgenic sugar beet: Transfer and expression herbicide resistance in hybrids with wild beets.* Euphytica, Vol. 91(1), S. 55-58

Bejjani S., Pullakhandam R., Punjal R., Nair KM. (2007): *Gastric digestion of pea ferritin and modulation of its iron bioavailability by ascorbic and phytic acids in caco-2 cells.* World Journal of Gastroenterology, Vol. 13(14), S. 2083-2088.

Bender, A., Breves, G., Stein, J., Leonhard-Marek, S., Schröder, B., Winckler, C. (2001): *Colonic fermentation as affected by antibiotics and acidic pH: Application of an in vitro model.* Zeitschrift für Gastroenterologie, Vol. 39(11), S. 911-918

- Bergqvist SW., Andlid T., Sandberg AS.** (2006): *Lactic acid fermentation stimulated iron absorption by Caco-2 cells is associated with increased soluble iron content in carrot juice.* British Journal of Nutrition, Vol. 96(4), S. 705-711
- Bernfeld P.** (1955): *Amylases, α and β .* Methods in Enzymology, Vol. 1, S.149-158
- Berstad A.** (1970): *A modified hemoglobin substrate method for the estimation of pepsin in gastric juice.* Scandinavian Journal of Gastroenterology, Vol. 5(5), S. 343-348
- Bill R. und Zehner ML.** (2001): *Lexikon der Geoinformatik.* Wichmann-Verlag Heidelberg
- Blanchard TG., Lycke N., Czinn SJ., Nedrud JG.** (1998): *Recombinant cholera toxin B subunit is not an effective mucosal adjuvant for oral immunization of mice against Helicobacter felis.* Immunology, Vol. 94(1), S. 22-27
- Blikslager, A. T., Zimmer, D. N., Young, K. M., Campell, N. B., Little, D., Argenzio, R. A.** (2002): *Recovery of ischaemic injured porcine ileum: evidence for a contributory role of COX-1 and COX-2.* Gut, Vol. 50, S. 615-23
- Blikslager, A. T., Roberts, M. C., Argenzio, R. A.** (1999b): *Prostaglandin-induced recovery of barrier function in porcine ileum is triggered by chloride secretion.* American Journal of Physiology, Vol. 276, S. G28-36
- Böhme H., Aulrich K., Daenicke R., Flachowsky G.** (2001): *Genetically modified feeds in animal nutrition. 2nd communication: glufosinate tolerant sugar beets (roots and silage) and maize grains for ruminants and pigs.* Archiv für Tierernährung, Vol. 54(3), S. 197-207
- Bradford MM.** (1976): *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Analytical Biochemistry, Vol. 72, S. 248-254
- Brandon EF., Oomen AG., Rempelberg CJ., Versantvoort CH., van Engelen JG., Sips AJ.** (2006): *Consumer product in vitro digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment.* Regulatory Toxicology Pharmacology, Vol. 44(2), S. 161-171
- Brake J., Vlachos D.** (1998): *Evaluation of transgenic event 176 "Bt" corn in broiler chickens.* Poultry Science, Vol. 77(5), S. 648-653
- Breves, G. und Diener, M.** (2000): *Funktionen des Dickdarmes.* In: Engelhardt, W. und Breves, G. (Hrsg.): Physiologie Haustiere. Enke Verlag Stuttgart, S. 406-408
- Breves, G.** (2000): *Nahrungsaufnahme und Speichelsekretion.* In: Engelhardt, W. und Breves, G. (Hrsg.): Physiologie Haustiere. Enke Verlag Stuttgart, S. 314
- Campbell, N. A.** (2000): *Biologie.* Hrsg. Jürgen Markl, 2. Nachdruck, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin

- Castañón, J.I.R., Flores, M.P., Pettersson, D.** (1997): *Mode of degradation of non-starch polysaccharides by feed enzyme preparations*. Animal Feed Science and Technology, Vol. 68(3-4), S. 361-365
- Castaón, S., Martín-Alonso, J.M., Marín, M.S., Boga, J.A., Alonso, P., Parra, F., Ordás, R.J.** (2002): *The effect of the promoter on expression of VP60 gene from rabbit hemorrhagic disease virus in potato plants*. Plant Science, Vol. 162(1), S. 87-95
- Castell J.V., Friedrich G., Kuhn CS., Poppe GE.** (1997): *Intestinal absorption of undegraded proteins in men: presence of bromelain in plasma after oral intake*. American Journal of Physiology, Vol. 273 (1 Pt 1), S. G139 – G146
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher DC.** (1994): *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, Vol. 263(5148), S. 802-805
- Chowanadisai W., Huang J., Huang N., Lönnerdal B.** (2003): *Stability of recombinant human alpha-1-antitrypsin produced in rice in infant formula*. Journal of Nutritional Biochemistry, Vol. 14(7), S. 386-393
- Chrenkova M., Sommer A., Ceresnakova Z., Nitrayova S., Prostredna M.** (2002): *Nutritional evaluation of genetically modified maize corn performed on rats*. Archives of Animal Nutrition, Vol. 56(3), S. 229-235
- Civan, M.M.** (1983): *2 Morphologic Studies, 3 Transepithelial electrical measurements*. In: CIVAN, M. M. Epithelial Ions and Transport Application of Biophysical Techniques. New York: Verlag John Wiley & sons; S. 5-31, 32-63.
- Clarke S. L. Jr.** (1959): *The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice*. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology., Vol. 5(1), S. 41-50
- Cone J.W., Jongbloed AW., Van Gelder AH., De Lange L.** (2005): *Estimation of protein fermentation in the large intestine of pigs using a gas production technique*. Animal Feed Science and Technology, Vol. 123-124 (Spec. Iss.) S. 463-472
- Craig SW., Cuatrecasas P.** (1976): *Immunological probes into the mechanism of cholera toxin action*. Immunology Communication, Vol. 5(5), S. 387-400
- Daunhauer A.** (2001): *Die Hyperurikämie: Risikoindikator oder unabhängiger Risikofaktor bei Patienten mit angiographisch dokumentierter koronarer Herzerkrankung?* Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Donkin SS., JC. Velez EP. Stanisiewski, GF. Hartnell** (2000): *Effect of feeding Roundup Ready corn silage and grain on feed intake, milk production and milk composition in lactating dairy cattle*. Journal of Dairy Sciences, Vol. 83 (Suppl. 1), S. 273
- Dubois M., Gilles K., Hamilton JK., Rebers PA., Smith F.** (1951): *A colorimetric method for the determination of sugars*. Nature, Vol. 168 (4265), S. 167

- Dupas C., Marsset Baglieri A., Ordonaud C., Tomé D., Maillard MN.** (2006): *Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study*. Molecular Nutrition and Food Research. Vol. 50(11), S. 1053-1060
- Eigler G.** (1935) *Die Funktion des lymphatischen Rachenringes* (1935) Archiv für Ohren-, Nasen- u. Kehlkopfheilkunde, Vol. 140(1), S. 62
- Einspanier, R., Lutz, B., Rief, S., Berezina, O., Zverlov, V., Schwarz, W., Mayer, J.** (2004): *Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize*. European Food Research and Technology, Vol. 218(3), S. 269-273
- Engle-Stone R., Yeung A., Welch R., Glahn R.** (2005): *Meat and ascorbic acid can promote Fe availability from Fe-phytate but not from Fe-tannic acid complexes*. Journal of Agricultural Food Chemistry Vol. 56(23), S. 10276-10284
- Entrup, N., Oehmichen, J.** (2000): *Lehrbuch des Pflanzenbaues – Kulturpflanzen*. Band 2, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen
- Ewerbeck H., Jaeger W.** (1954): *Über den fermentativen Abbau der Proteine und Fette moderner Säuglingsnahrung in- vitro*. Zeitschrift für Kinderheilkunde Vol. 75, S. 496-511
- Fässler C., Arrigoni E., Venema K., Hafner V., Brouns F., Amadò R.** (2006): *Digestibility of resistant starch containing preparations using two in vitro models*. European Journal Of Nutrition, Vol. 45(8), S. 445-453
- Fermi C.** (1901) *Untersuchungen über die Verdaulichkeit der einzelnen Nahrungsmittel im Magen*. Giorn. R. Soc. ital. Igien., 1.Ref. in: Jahresber. Leist. Geb. Veterinär-Med. 21, S.204.
- Fernández-Fernández, M.R., Mouriño, M., Rivera, J., Rodríguez, F., Plana-Durán, J., García, J.A.** (2001): *Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector*. Virology Vol. 280(2) S. 283-29
- Ferruzzi MG., Failla ML., Schwartz SJ.** (2001): *Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an in vitro digestion and Caco-2 human cell model*. Journal of Agricultural Food Chemistry Vol. 49(4), S. 2082-2089
- Flachowsky G., Aulrich K., Böhme H., Daenicke R.** (2000): *Transgene Kost fürs liebe Vieh Fütterungsversuche mit gentechnisch veränderten Futtermitteln*. ForschungsReport 1/2000, S. 32 – 35
- Flachowsky G., Aulich K.** (1999): *Tierernährung und gentechnisch veränderte Organismen*. Landbauforschung Völkenrode Vol 1. 49(1), S. 13-20
- Flachowsky G.** (2007): *Beiträge zur ernährungsphysiologischen und Sicherheitsbewertung von Futtermitteln aus gentechnisch veränderten Pflanzen*. Symposium „Bewertung neuartiger Futtermittel“, 16.04.2007 in Bonn

- Flachowsky G., Aulrich K., Böhme H., Halle I.** (2007): *Studies on feeds from genetically modified plants (GMP) – Contributions to nutritional and safety assessment.* Animal feed Science and Technology Vol. 133, S. 2–30
- Freytag L C., Clements JD.** (2005): *Mucosal adjuvants.* Vaccine Vol. 23(15), S. 1804-1813
- Fuchs R L., Ream J.E., Hammond B.G., Naylor M.W., Leimgruber R.M., Berberich S.A.** (1993): *Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein.* Biotechnology , (N. Y.) Vol. 13, S. 1543-7
- Garrett D.A., Failla M.L., Sarama R.J.** (1999): *Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals.* Journal of Agricultural Food Chemistry Vol. 47(10), S. 4301-4309
- Georgopoulou U., Dabrowski K., Sire M.F., Vernier J.M.** (1988): *Absorption of intact proteins by the intestinal epithelium of trout, Salmo gairdneri. A luminescence enzyme immunoassay and cytochemical study.* Cell Tissue Research, Vol. 251(1), S. 145-152
- Gedek, B.R.** (1994): *Mycotoxins as health risks for man.* Mycoses, Vol. 37(2) SUPPL. 1, S. 43-49
- Geisler, G.** (1991): *Farbatlas Landwirtschaftliche Kulturpflanzen.* Ulmer Verlag, Stuttgart
- Gil, F., Titarenko, E., Terrada, E., Arcalís, E., Escribano, J.M.** (2006): *Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies.* Plant Biotechnology Journal, Vol. 4(1), S 135-143
- Glahn R P., Wortley GM., South PK., Miller DD.** (2002): *Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid, and ZnCl₂: studies using an in vitro digestion/Caco-2 cell model.* Journal of Agricultural Food Chemistry Vol. 50(2), S. 390-395
- Granado-Lorencio F., Olmedilla-Alonso B., Herrero-Barbudo C., Perez-Sacristan B., Blanco-Navarro I., Blazquez-Garcia S.** (2007): *Comparative in Vitro Bioaccessibility of Carotenoids from Relevant Contributors to Carotenoid Intake.* Journal of Agricultural Food Chemistry Vol. 55(15), S. 6387-94
- Hagemann, M.; Mößler, A.; Kamphues, J.; Riehl, M.; Giersberg, M.; Saalbach, I.; Falkenburg, D; Verspohl, J.** (2006): *Investigations on effects of oral application of antibodies (produced in transgenic peas) in weaned piglets experimentally infected with F4 (K88) positive enterotoxigenic E. coli (ETEC).* Proceedings of the 10th ESVCN Congress, S. 92 -93
- Heckenberger G.** (2006): *Untersuchungen zum Einsatz von Bt-Mais in der Lämmermast.* 118. VDLUFA Kongress 2006 in Freiberg
- Hedemann MS., Jensen BB.** (2004): *Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning.* Archives of Animal Nutrition Vol. 58(1), S. 47-59

Helf, Gertraud Maria-Anna (2011): *Anwendung von Omega-3 Fettsäuren aus Fischöl vor kolonchirurgischen Eingriffen und die Auswirkungen auf postoperative Komplikationen und die Wundheilung*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Heppner F.L., Christ A.D., Klein M.A., Prinz M., Fried M., Kraehenbuhl J.P., Aguzzi A. (2001): *Transepithelial prion transport by M- cells*. *Nature medicine* Vol. 7(9), S. 976-977

Heyman M., Desjeux JF. (1992): *Significance of intestinal food protein transport*. *Journal of Pediatric, Gastroenterology and Nutrition*. 15 (1) 48-57

Holtug K., Skathauge E. (1991): *Ion transport across isolated pig jejunum*. *American Journal of Physiology*, Vol. 260, G220-31

Hommel B. und Roppel P. (2004): *Auswirkungen auf phänotypische und pflanzenschutzrelevante Eigenschaften von Fructan-Kartoffeln im Vergleich mit der Ausgangssorte und konventionellen Sorten*. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für integrierten Pflanzenschutz Kleinmachnow, Poster Statusseminar „Sicherheitsforschung und Monitoring“

Hu Y., Cheng Z., Heller LI., Krasnoff SB., Glahn RP., Welch RM. (2006): *Kaempferol in red and pinto bean seed (Phaseolus vulgaris L.) coats inhibits iron bioavailability using an in vitro digestion/human Caco-2 cell model*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol. 54(24), S. 9254-9261

Huang FP., Farquhar CF., Mabbott NA., Bruce ME., MacPherson GG. (2002): *Migrating intestinal dendritic cells transport PrP (Sc) from the gut*. *Journal of Genetic and Virology*, Vol. 80(Pt1), S. 267-271

Jackson P. (1990): *The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device*. *Biochemistry Journal* Vol. 270(3), S. 705-713

Jagger, S., Wiseman, J., Cole, D.J.A., Craigon, J. (1992): *Evaluation of inert markers for the determination of ileal and faecal apparent digestibility values in the pig*. *British Journal of Nutrition*, Vol. 68(3), S. 729-739

Jeroch, H.; Drochner, W.; Simon, O. (1999): *Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere : Ernährungsphysiologie, Futtermittelkunde, Fütterung.*, Ulmer Verlag, Stuttgart

Jertborn M., Nordström I., Kilander A., Czerkinsky C., Holmgren J. (2001): *Local and systemic immune responses to rectal administration of recombinant cholera toxin B subunit in humans*. *Infect Immunology*, Vol. 69(6), S. 4125-4128

Jones EA., Waldmann TA. (1972): *The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat*. *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 51(11), S. 2916-2927

Jovani M., Barbera R., Farre R., Martin de Aguilera E. (2001): *Calcium, iron, and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells*. *Journal Agricultural Food Chemistry*, Vol. 49(7), S. 3480-3485

- Kalgaonkar S., Lonnerdal B.** (2008): *Effects of dietary factors on iron uptake from ferritin by Caco-2 cells*. Journal of Nutrition and Biochemistry, Vol. 19(1) S. 33-9
- Kellett, G. L.** (2001): *The facilitated component of intestinal glucose absorption*. Journal of Physiology, Vol 531, S. 585-95
- Keydel F., Kupfer H., Killermann B.** (2005): *Die Landwirtschaft / Pflanzliche Erzeugung : Kapitel Pflanzenzüchtung und Saatgutwesen*. 12. Auflage, Band 1, BLV-Buchverlag, München
- Kirchgessner, M.** (1992): *Einflüsse auf die Verdaulichkeit*. In: Kirchgessner, M. (Hrsg.) Tierernährung. DLG-Verlag Frankfurt (M), S. 31
- Kolb, E.,**(Hrsg.), (1989): *Lehrbuch der Physiologie der Haustiere.*, 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena
- Kong Q., Richter L., Yang YF., Arntzen CJ., Mason HS., Thanavala Y.** (2001): *Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 98(20), S. 11539-11544
- Kopper RA., Odum NJ., Sen M., Helm RM., Steve Stanley J., Wesley Burks A.** (2004): *Peanut protein allergens: gastric digestion is carried out exclusively by pepsin*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, Vol. 114(3), S. 614-618
- Kulp KS., Fortson SL., Knize M.G., Felton JS.** (2003): *An in vitro model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix*. Food and Chemical Toxicology, Vol. 41(12), S. 1701-1710
- Laparra JM., Vélez D., Montoro R., Barberá R., Farré R.** (2003): *Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method*. Journal of Agricultural Food Chemistry, Vol. 51(20), S. 6080-6085
- Lauterslager, TGM., Florack, DEA., Van Der Wal, TJ., Molthoff, JW., Langeveld, JPM., Bosch, D., Boersma, WJA., Hilgers, LATH.** (2001): *Oral immunisation of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B*. Vaccine, Vol. 19(17-19), S. 2749-2755
- Lencer WL., Tsai B.** (2003): *The intracellular voyage of cholera toxin: going retro*. Trends in Biochemical Sciences, Vol. 28(12), S. 639-645
- Liu CS., Glahn R P., Liu RH.** (2004): *Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion*. Journal of Agricultural Food Chemistry, Vol. 52(13), S. 4330-7
- Lodemann, U., Martens, H.** (2006): *Effects of diet and osmotic pressure on Na⁺ transport and tissue conductance of sheep isolated rumen epithelium*. Experimental Physiology, Vol. 91(3), S. 539-550

- Lorenz, B.** (2006): *Wirkungen von Bacillus cereus variatio toyoi auf transportphysiologische Parameter des mittleren Jejunums von Ferkeln im Alter von 2 bis 8 Wochen*. FU Berlin, Dissertation,
- Lycke N., Karlsson U., Sjölander A., Magnusson KE.** (1991): *The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens*. Scandinavian Journal of Immunology, Vol. 33(6), S. 691-698
- Ma, S.W., Zhao, D.L., Yin, Z.Q., Mukherjee, R., Singh, B., Qin, H.-Y., Stiller, C.R., Jevnikar, A.M.** (1997): *Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance*. Nature Medicine Vol. 3(7), S. 793-796
- Madara, J. L.** (1989): *Loosening tight junctions. Lessons from the intestine*. Journal of Clinical Investigation, Vol. 83, S.1089-94
- Madara, J. L., Dharmasathaphorn K.** (1985): *Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer*. Journal of Cell Biology, Vol 101, S. 2124-33
- Madec, J.Y., Vanier, A., Dorier, A., Bernillon, J., Belli, P., Baron, Th.** (1997): *Biochemical properties of protease resistant prion protein PrP^{Sc} in natural sheep scrapie*. Archives of Virology, Vol. 142(8), S.1603-1612
- Maier, S. A.** (2003): *Entwicklung eines Mini-Gefriertrockners : Kontrollierte Herstellung und Charakterisierung von Trägerlyophilisaten zur Anwendung am Auge*. Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn, Dissertation
- Maekawa AA., Glahn RP., Lei XG., Miller DD.** (2006): *Effect of bread baking on the bioavailability of hydrogen-reduced iron powder added to unenriched refined wheat flour*. Journal of Agricultural Food Chemistry, Vol. 54(21), S. 8362-8368
- Marth T., Stallmach A.** (2001): *Is induction of oral tolerance to insulin a suitable treatment concept in therapy of type I diabetes mellitus?* Zeitschrift für Gastroenterologie, Vol. 39(5), S. 437-43
- Martín-Alonso JM., Castañón S., Alonso P., Parra F., Ordás R.** (2003): *Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein*. Transgenic Research, Vol. 12(1), S. 127-130
- Maskell I., Smithard R.** (1994): *Degradation of glucosinolates during in vitro incubations of rapeseed meal with myrosinase (EC 3.2.3.1) and with pepsin (EC 3.4.23.1)-hydrochloric acid, and contents of porcine small intestine and caecum*. British Journal of Nutrition, Vol. 72(3), S. 455-466
- Mauron J., Mottu F., Bujard E., Egli RH.** (1955): *The availability of lysine, methionine and tryptophan in condensed milk and milk powder; in vitro digestion studies*. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 59(2), S. 433-451
- Mbanya J C., Mfopou JK., Sobngwi E., Mbanya DN., Ngogang JY.** **Cameroon Study** (2005): *Metabolic and hormonal effects of five common African diets eaten as mixed meals: the Cameroon Study*. European Journal of Clinical Nutrition, Vol. 57(4), S. 580-5

- McDonough FE., Sarwar G., Steinke FH., Slump P., Garcia S., Boisen S.** (1990): *In vitro* assay for protein digestibility: interlaboratory study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, Vol. 73(4), S. 622-625
- McKay WA., Memmott SD.** (1991): *An investigation of the availability of ^{137}Cs and $^{239} + ^{240}\text{Pu}$ for gut absorption in winkles following cooking and in vitro simulated gastro-intestinal digestion.* Food Additives and Contaminantes, Vol. 8(6), S. 781-786
- Michaelis L. und Menten ML.** (1913): *Die Kinetik der Invertinwirkung.* Biochemische Zeitschrift Vol. 49, S. 333-369
- Mikschofsky H.** (2006): *Charakterisierung des Produktionssystems Pflanze für die rekombinante Impfstoffherzeugung.* Dissertation Universität Rostock
- Miller CE., Majewski J., Kjaer K., Weygand M., Faller R., Satija S., Kuhl TL.** (2005): *Neutron and X-ray scattering studies of cholera toxin interactions with lipid monolayers at the air-liquid interface.* Colloids Surfaces B. Biointerfaces, Vol. 40(3-4), S. 159-163
- Miller DD., Schriker BR., Rasmussen R.R., Van Campen D.** (1981) *An in vitro method for estimation of iron availability from meals.* American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 34(10), S. 2248-56
- Molvig L., Tabe LM., Eggum BO., Moore AE., Craig S., Spencer D., Higgins TJ.** (1997): *Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene.* Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 94(16), S. 8393-8398
- Moreno FJ., Mackie AR., Mills EN.** (2005): *Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion.* Journal of Agricultural Food Chemistry, Vol. 53(25), S. 9810-6
- Moreno FJ.** (2007): *Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity.* Biomedical and Pharmacotherapy, Vol. 61(1), S. 50-60
- Mokrasch L.C.** (1967): *Use of 2,4,6 Trinitrobenzenesulfonic Acid for the coestimation of amines, amino acids and proteins in mixtures.* Analytical Biochemistry, Vol. 18, S. 64-71
- Neumann J., Bruch M., Gebauer S., Brandsch M.** (2004): *Transport of the phosphonodi-peptide alafosfalin by the H^+ /peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2 in intestinal and renal epithelial cells.* European Journal of Biochemistry, Vol. 271(10), S. 2012-2017
- Okunuki H., Teshima R., Shigeta T., Sakushima J., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Sawada J.** (2002): *Increased digestibility of two products in genetically modified food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after preheating.* Shokuhin Eiseigaku Zasshi Vol. 43(2), S. 68-73
- Oomen, AG., Rempelberg, CJM., Bruil, MA., Dobbe, CJG., Pereboom, DPKH., Sips, AJAM.** (2003): *Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants.* Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 44(3), S. 281-287

- Oomen, A.G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele T., Wragg, J., Rompelberg, C.J., Sips, A.J., Van Wijnen, J.H.** (2002): *Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants*. Environmental Science Technology, Vol.36 (15), S. 3326-3334
- Padgett SR., Kolacz KH., Delannay X., Re DB., Lavallee BJ., Tinius CN., Rhodes WK., Otero YI., Barry GF., Eichholtz DA., Peschke VM., Nida DL., Taylor NB., Kishore GM.** (1995): *Development, Identification, and Characterization of A Glyphosate-Tolerant Soybean Line*. Crop Science Vol. 35(5), S. 1451-1461
- Pasini, G.; Simonato, B.; Giannattasio, M.; Peruffo, A. D. B.; Curioni, A.** (2001): *Modifications of Wheat Flour Proteins during in Vitro Digestion of Bread Dough, Crumb and Crust: An Electrophoretic and Immunological Study*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 49, S. 2254 – 2261
- Peyron S., Mouecoucou J., Fremont S., Sanchez C., Gontard N.** (2006): *Effects of heat treatment and pectin addition on beta-lactoglobulin allergenicity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 54(15), S. 5643-5650
- Pikal, M. J.** (1992): *Encyclopedia of Pharmaceutical Technologie*. 6, Marcel Dekker, Inc., New York, S. 275 - 303
- Plana-Duran, J., Bastons, M., Rodriguez, M.J., Climent, I., Cortés, E., Vela, C., Casal, I.** (1996): *Oral immunization of rabbits with VP60 particles confers protection against rabbit hemorrhagic disease*. Archives of Virology Vol.141(8), S. 1423-1436
- Prieto, J.M., Fernandez, F., Alvarez, V., Espi, A., García Marín, J.F., Alvarez, M., Martín, J.M., Parra, F.** (2000): *Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits*. Research in Veterinary Science Vol. 68(2), S. 181-187
- Powell, D. W.** (1981): *Barrier functions of epithelia*. American Journal of Physiology, Vol. 241, S. G275-88
- Pynaert I., Armah C., Fairweather-Tait S., Kolsteren P., van Camp J., De Henauw S.** (2006): *Iron solubility compared with in vitro digestion-Caco-2 cell culture method for the assessment of iron bioavailability in a processed and unprocessed complementary food for Tanzanian infants (6-12 months)*. British Journal of Nutrition, Vol. 95(4), S. 721-6
- Qiao Y., Lin X., Odle J., Whittaker A., van Kempen TA.** (2004): *Refining in vitro digestibility assays: fractionation of digestible and indigestible peptides*. Journal of Animal Sciences, Vol. 82(6), S. 1669-1677
- Ramamoorthy S., Liu W., Ma YY., Yang-Feng TL., Ganapathy V., Leibach FH.** (2006): *Proton/peptide cotransporter (PEPT 2) from human kidney: functional characterization and chromosomal localization*. Biochimica and Biophysica Acta, Vol. 12740(1), S. 1-4
- Reuter T., Aulrich K., Berk A., Flachowsky G.** (2002): *Investigations on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: chemical composition and nutritional evaluation*. Archiv für Tierernährung, Vol. 56(1), S. 23-31

- Rigano MM., Walmsley AM.** (2005): *Expression systems and developments in plant-made vaccines*. Immunology and Cell Biology, Vol. 83(3), S. 271-277
- Rodewald R.** (1973): *Intestinal transport of antibodies in the newborn rat*. Journal of Cell Biology, Vol. 58(1), S. 189-211
- Rodriguez RR., Basta NT., Casteel SW., Pace LW** (1999): *An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media*. Environmental Sciences and Technology, Vol. 33, S. 642-649
- Sabharwal N., Icoz I., Saxena D., Stotzky G.** (2007): *Release of the recombinant proteins, human serum albumin, beta-glucuronidase, glycoprotein B from human cytomegalovirus, and green fluorescent protein, in root exudates from transgenic tobacco and their effects on microbes and enzymatic activities in soil*. Plant Physiology and Biochemistry, Vol. 45(6-7), S. 464-469
- Sala, F., Rigano, M. M.; Barbante, A., Basso, A., Walmsley, A.M., Castiglione, S.:** (2003): *Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives*. Vaccine 21, S. 803–808
- Salomon, V.S.** (2008): *Magen, Ventriculus (Gaster)*. In: Salomon u. a. (Hrsg.): *Anatomie für die Tiermedizin*. Enke-Verlag Stuttgart, 2. erw. Aufl., S. 272–293
- Salomon, V.S.** (2008): *Darm, Intestinum (Enteron)*. In: Salomon u. a. (Hrsg.): *Anatomie für die Tiermedizin*. Enke-Verlag Stuttgart, 2. erw. Aufl., S. 293–311
- Salomon, V.S.** (2008): *Verdauungsapparat, Apparatus digestorius*. In: Salomon u. a. (Hrsg.): *Anatomie für die Tiermedizin*. Enke-Verlag Stuttgart, 2. erw. Aufl., S. 235–323,
- Sartia B., Lopez-Fandino R., Vaquero MP.** (2001): *Does processing of a powder or in-bottle-sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability?* Nutrition Vol. 17(4), S. 326-331
- Sauer WC, Jorgensen H., Berzines R.** (1983): *A modified nylon bag technique for determining the apparent protein digestibility in feedstuffs of pigs*. Canadian Journal of Animal Sciences, Vol. 6, S. 233–237
- Savoie L., Charbonneau R., Parent G.** (1989): *In vitro amino acid digestibility of food proteins as measured by the digestion cell technique*. Plant foods for human nutrition, Vol. 39(1), S. 93-107
- Scharrer, E., und Wolffram, S.** (2000): *Funktionen des einhöhligen Magens*. In: Engelhardt, W. und Breves, G. (HRSG.): *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag Stuttgart, S. 374
- Scharrer, E., und Wolffram, S.** (2000): *Funktionen des Dünndarms und seiner Anhangsdrüsen*. In: Engelhardt, W. und Breves, G. (HRSG.): *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag Stuttgart, S. 374
- Scheffler A.** (1984): *Charakterisierung der Wirkung von Pharmaka auf die elektrophysiologischen Parameter gastrointestinaler Epithelgewebe mit einer mikrocomputer-gesteuerten Strom- und Spannungsklemmeinrichtung*. Dissertation, Aachen, Hochschule Aachen

- Scherbel C., Pichner R., Groschup MH., Mueller-Hellwig S., Scherer S., Dietrich R., Maertlbauer E., Gareis M.** (2007): *Infectivity of scrapie prion protein (PrP^{Sc}) following in vitro digestion with bovine gastrointestinal microbiota*. Zoonoses Public Health. Vol. 54(5), S. 185-190
- Scheunert A., Trautmann A.** (1987): *Lehrbuch der Veterinär-Physiologie*, Verlag Paul Parey 7. Auflage, S.63
- Schlamowitz M., Peterson LU.** (1959): *Studies on the optimum pH for the action of pepsin on "native" and denatured bovine serum albumin and bovine haemoglobin*. Journal of Biology and Chemistry, Vol. 234, S. 3137-3745
- Schüler J., Wink M., Hell R.** (2004): *Molekulare Biotechnologie – Konzepte und Methoden*, Wiley-Vch Verlag, Weinheim
- Shen LH., Luten J., Robberecht H., Bindels J., Deelstra H.** (1994): *Modification of an in vitro method for estimating the bioavailability of zinc and calcium from foods*. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, Vol. 199(6), S. 442-445
- Simonato B., Pasini G., Giannattasio M., Peruffo AD., De Lazzari F., Curioni A.** (2001): *Food allergy to wheat products: the effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergenic proteins. A study with bread dough, crumb and crust*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 49(11), S. 5668-5673
- Snoeck V., Cox E., Verdonck F., Joensuu J.J., Goddeeris BM.** (2004): *Influence of porcine intestinal pH and gastric digestion on antigenicity of F4 fimbriae for oral immunisation*. Veterinary Microbiology, Vol. 98(1), S. 45-53
- Somogyi M.** (1938): *Micromethods for the estimation of diastase*. Journal of Biology and Chemistry, Vol. 125, S. 299-414
- Spencer J.D., Allee G.L., Sauber T.E.** (2000): *Phosphorus bioavailability and digestibility of normal and genetically modified low-phytate corn for pigs*. Journal of Animal Science, Vol. 78(3), S. 675-681
- Spreeuwenberg MA., Verdonk JM., Gaskins HR., Verstegen MW.** (2001): *Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning*. Journal of Nutrition, Vol. 131(5), S. 1520-1527
- Steinbüchel, A.** (2006): *Biopolymere und Vorstufen: Cyanophycin*. In: Garabed Antranikian (Hrsg.): Angewandte Mikrobiologie. Springer-Verlag Berlin und Heidelberg; S. 387-388
- Stuck, K., Faul, K., Hylla, S., Stein, J., Breves, G.** (1995): *The application of a semi-continuous colon simulation technique (Cositec) for studying the effects of clindamycin on microbial hindgut metabolism*. Zeitschrift für Gastroenterologie, Vol. 33(5), S. 241-246
- Tacket, C.O., Mason, H.S., Losonsky, G., Clements, J.D., Levine, M.M., Arntzen, C.J.** (1998): *Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato*. Nature Medicine, Vol. 4(5), S. 607-609

- Tashiro M., Ikegami S.** (1999): *Changes in activity, antigenicity, and molecular size of rice bran trypsin inhibitor by in vitro digestion* Journal of Nutritional Science and Vitaminology, Vol. 42(4), S. 367-76
- Taylor NB., Fuchs RL., MacDonald J., Shariff AR., Padgett SR.** (1999): *Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 47(10), S. 4469-4473
- Terada S., Kato T., Izumiya N.** (1975): *Synthesis and hydrolysis by pepsin and trypsin of a cyclic hexapeptide containing lysine and phenylalanine.* European Journal of Biochemistry, Vol. 52(2), S. 273-82
- Tian Q., Failla ML., Bohn T., Schwartz SJ.** (2006): *High-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry determination of cholesterol uptake by Caco-2 cells.* Rapid Communication Mass Spectrometry, Vol. 20(20), S. 3056-60
- Tony M.A., Butschke A., Broll H., Grohmann L., Zagon J., Halle I., Dänicke S., Schauzu M., Hafez HM., Flachowsky G.** (2003): *Safety assessment of Bt 176 maize in broiler nutrition: degradation of maize-DNA and its metabolic fate.* Archiv für Tierernährung, Vol. 57(4), S. 235-252
- Terpend K., Boisgerault F., Blaton MA., Desjeux JF., Heyman M.** (1998): *Protein transport and processing by human HT29-19A intestinal cells: effect of interferon gamma.* Gut, Vol. 42(4), S. 538-545
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** (1979): *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 76(9), S. 4350-4354
- Turner JR.; Rill BK., Carlson SL.; Carnes D., Kerner R., Mrsny RJ., Madara JL.** (1997): *Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chainphosphorylation.* American Journal of Physiology, Vol. 273, S. C1378-85
- Ussing HH.** (1949): *The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.* Acta Physiology Scandinavian, Vol.17, S. 1-37
- Ussing HH., Zerahn K.** (1951): *Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.* Acta Physiology Scandinavian, Vol. 23(2-3), S. 110-127
- Vázquez-Padrón, R.I., Gonzáles-Cabrera, J., García-Tovar, C., Neri-Bazan, L., López-Revilla, R., Hernández, M., Moreno-Fierro, L., De La Riva, G.A.** (2000): *CryIAc protoxin from Bacillus thuringiensis sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine.* Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 271(1), S. 54-58
- Veith D., Veith M.** (2005): *Biologie fluoreszierender Proteine: Ein Regenbogen aus dem Ozean.* Biologie in unserer Zeit, Vol. 6, S. 394-40

- Verdonk JMAJ., Spreeuwenberg MAM., Onderwater RCA., Verstegen MWA.** (2001): *Nutrient intake level affects in vitro permeability of the small intestine of pigs*. Journal of Physiology and Biochemistry, Vol. 58(4), S. 269
- Vieths S., Reindl J., Müller U., Hoffmann A., Haustein D.** (1999): *Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure*. European Food Research Technology, Vol. 209, S. 379-388
- de Vries J, Wackernagel W.** (1998): *Detection of nptII (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation*. Molecular and General Genetics, Vol. 257(6), S. 606-13
- Waisberg M., Black WD., Waisberg CM., Hale, B.** (2004): *The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (Lactuca sativa L. cv. Ostinata)*. Food and Chemical Toxicology, Vol. 42(5), S. 835-842
- Walker RI.** (1994): *New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization*. Vaccine Vol. 12(5), S.387-400
- Walmsley A.M., Arntzen, C.J.** (2000): *Plants for delivery of edible vaccines*. Current Opinion in Biotechnology Vol.11 (2), S. 126-129
- Warshaw AL., Walker WA., Cornell R., Isselbacher KJ.** (1971): *Small intestinal permeability to macromolecules. Transmission of horseradish peroxidase into mesenteric lymph and portal blood*. Laboratory Investigation, Vol. 25(6), S. 675-684
- Weiner ML.** (1988): *Intestinal transport of some macromolecules in food*. Food and Chemical Toxicology, Vol. 26(10), S. 867-880
- Weng YM., Hotchkiss JH., Babish JG.** (1992): *N-nitrosamine and mutagenicity formation in Chinese salted fish after digestion*. Food Additives and Contaminants, Vol. 9(1), S. 29-37
- Wiesemuller W., Poppe S.** (1990): *Protein digestion in pigs measured in vitro*. Archiv für Tierernährung, Vol. 40(8), S. 689-693
- Wigotzki M., Schubert S., Steinhart H., Paschke A.** (2000): *Effects of in vitro digestion on the IgE-binding activity of proteins from hazelnuts (Corylus avellana)*. Internet Symposium on Food Allergens Vol. 2, S. 1-8
- Winckler C.** (1997): *In-vitro-Untersuchungen zur Wirkung von Saccharomyces boulardii, Bacillus cereus varcaron und Bacillus cereus var. toyoi auf die intestinale Barriere beim Schwein*. Dissertation, Universität Gießen
- Wolffram S., Frischknecht R.,Scharre E.** (2010): *Influence of Theophylline on the Electrical Potential Difference and Ion Fluxes (Na, Cl, K) across the Isolated Rumen Epithelium of Sheep*. Journal of Veterinary Medicine Series A, Vol. 36(1-10), S. 755–762
- Yamaguchi K., Oikawa T., Nogami H., Moriwaki C.** (1983): *Studies on membrane transport in sensitized rats. I. Absorption of horseradish peroxidase from the intestine of sensitized and non-sensitized rats*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Vol. 3(2), S. 584-590

Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. (2000): *Engineering the Provitamin A(b-Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm*. Science, Vol. 287(5451), S. 303-305

Young, J.A., Cook, D.I., Lingard, M. L., van Lennep, E.W., Wegman, E. (1996): *Funktionen des Magen-Darm-Trakts* In: Klinke, R. und Silbernagl, s. (HRSg.): Lehrbuch der Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 387-433

Yu J., Langridge WH. (2001): *A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases*. Nature Biotechnology, Vol. 19(6), S. 548-552

Zhang P., Yang QB., Balkovetz DF., Lewis JP., Clements JD., Michalek SM., Katz J. (2005): *Effectiveness of the B subunit of cholera toxin in potentiating immune responses to the recombinant hemagglutinin/adhesin domain of the gingipain Kgp from Porphyromonas gingivalis*. Vaccine, Vol. 23(39) 4734-4744

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anbau von Bt-Mais in Deutschland (Quelle: Standortregister Deutschland)	12
Abb. 2: gehäckselte, frische Kartoffelknollen.....	46
Abb. 3: gehäckselte, frische Tabakblätter	46
Abb. 4: Aufbau eines Semidry-Western-Blots.....	55
Abb. 5: schematische Darstellung des Ussing-Kammer Systems nach Scientific Instruments (Aachen).....	57
Abb. 6: Belegung des Objektträgers mit 4 Schnitten (2 Schnitte pro Antikörperkonzentration)	59
Abb. 7: scheinbare Verdaulichkeiten der Fraktionen von Jungsauenaufzuchtfutter,.....	63
(RA-Rohasche, RP-Rohprotein, RF-Rohfaser, OS-Organische Substanz)	63
Abb. 8: scheinbare in vivo Verdaulichkeiten der Fraktionen von Kartoffeln im Magen.....	64
und Ileum von Schweinen	64
Abb. 9: Abbau (%) von Jungsauenaufzuchtfutter durch Pepsin mit und ohne	65
vorherige Amylaseinkubation	65
Abb. 10: Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch Amylase und Amylasepuffer.....	66
Abb. 11: Entstehung von Oligosacchariden im Überstand von Jungsauenaufzuchtfutter	
nach der Inkubation mit α -Amylase	67
Abb. 12: zeitliche Stabilität von Pepsin gemessen in Units /ml.....	67
Abb. 13: Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch Pepsin-HCl über einen Zeitraum.....	
von 240 min	68
Abb. 14: Freisetzung von Stickstoff in die flüssige Phase.....	69
Abb. 15: Masseverlust durch verschiedene Pepsinkonzentrationen ($g \cdot l^{-1}$)	69
Abb.16: Zunahme der freien NH_2 -Gruppen beim Abbau von BSA durch.....	
Pepsin.....	70
Abb. 17: Masseverlust an Jungsauenaufzuchtfutter durch mehrmalige Zugabe.....	
von Pepsin	71
Abb. 18: Masseverlust an Jungsauenaufzuchtfutter durch Einwirkung von	
Pankreatin und Galle	72
Abb. 19: Dünnschichtchromatographie von Rohfettextrakten aus Jungsauenaufzuchtfutter	73
Abb. 20: Gehalt an Triglyceriden im Rohfettextrakt	74
Abb. 21: Zunahme der freien $-NH_2$ Gruppen aus BSA durch Pankreatin.....	75

Abb. 22: Abbau von Milchpulver durch Amylase, Pepsin-HCl und HCl.....	75
Abb. 23: in vitro Verdaulichkeiten der Fraktionen von Jungsauenaufzuchtfutter mit.....	
verschiedenen Korngrößen (0,2 und 2 mm, n=6)	76
Abb. 24: Stickstofffreisetzung in die flüssige Phase bei der in vitro	
Verdauung (ivV) von Jungsauenaufzuchtfutter (n=6).....	77
Abb. 25: in vitro Verdaulichkeiten der Fraktionen von Kartoffel Albatros.....	78
Abb. 26: Stickstofffreisetzung in die flüssige Phase bei ivV von Kartoffel Alba (n=3).....	78
Abb. 27: Modellierung der Freisetzung von Proteinen aus Pflanzen.....	80
Abb. 28: Konzentration der maximalen Proteinfreisetzungskonzentration (MaxF)	
in µg/ml bei verschiedenen Pflanzen und Aufschlussarten.....	81
Abb. 29: Abbau des Gesamtproteins durch Pepsin (A-CTB lyophilisiert; n=6).....	82
Abb. 30: Zeitlicher Verlauf des CTB-Abbaus (ng/ml) nach Inkubation mit	
Pepsin – HCl Lösung über 90 Minuten	84
Abb. 31: Zeitlicher Verlauf des CTB- Abbaus (ng/ml) nach Inkubation mit	
Pepsin–HCl- Lösung über 120 Minuten	84
Abb. 32: Bestimmung der Proteine aus lyophilisiertem Pflanzenmaterial nach der.....	
Behandlung mit Verdauungsenzymen n=6	85
Abb. 33: Diffusion von ³ H-Mannitol an verschieden „gestrippten“ Schweine-Ileum	88
Abb.34: Hemmung des Transportes von GFP durch Glibenglamid	90
Abb. 35: Transport von VP60 (VP) und VP60-CTB Fusionsprotein (n=15) am.....	
terminalem Ileum	91
Abb. 36: Terminales Schweineileum, ohne Muscularis, Kontrolle ohne Inkubation in der	
Ussing-Kammer	92
Abb. 37: Terminales Schweineileum ohne Muscularis, nach 40 min in der Ussing-Kammer	92
Abb. 38: Terminales Ileum vom Schwein ohne Muscularis nach 6 h in der Ussing-Kammer	92
Abb. 40: Terminales Ileum vom Schwein, nach 6 h Inkubation mit GFP, Durchlichtaufnahme	
.....	93
Abb. 39: Terminales Ileum vom Schwein, nach 6 h Inkubation mit GFP, Detektion von GFP	
in grün, Becherzellen rot	93
Abb. 41: Gehalt von NPTII im Zentrifugat von Chymus auf Gesamtprotein bezogen	96
Abb. 42: Box-Plot der NPTII Konzentration (C NPT II) im Serum während des.....	
Fütterungsversuches (n=12)	97
Abb. 43: scheinbare in vitro Verdaulichkeiten von Jungsauenaufzuchtfutter (JSAF)	
und Kartoffeln (A-CY)	108

Abb. 44: Schema der entwickelten in vitro Simulation	112
--	-----

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verdauungsenzyme (Quelle: Kolb, Lehrbuch der Tierphysiologie).....	21
Tab. 2: verschiedene Parameter der Simulation der Magenverdauung.....	26
Tab. 3: verschiedene Parameter der Simulation der Dünndarmverdauung.....	27
Tab. 4: Permeabilitätskoeffizienten für Mannitol an Kaninchengewebe in $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$	36
Tab. 5: Übersicht der zur Verfügung stehenden gentechnisch veränderten Pflanzen.....	42
Tab. 6: Konzentrationen der Antikörper bei Western-Blots	55
Tab. 7: verschiedene Speichelaktivitäten	62
Tab. 8: Pepsinaktivitäten in Units/ml bestimmt nach Anson (1938)	63
Tab. 9: Masseverlust durch Pankreatin / Gallenextrakt im Vergleich zu den anderen Verdauungsschritten.....	71
Tab. 10: Bestimmung der Flüssigkeitsaufnahmen von lyophilisierten Pflanzenmaterial	79
Tab. 11: Parameter tmax und cmax bei der Proteinfreisetzung verschieden behandelter Pflanzenteile (n=7).....	80
Tab. 12: P-Werte zu den Daten aus Tab. 5	81
Tab. 13: Veränderungen des Proteingehaltes während der Lagerung von lyophilisierten Pflanzenmaterial	86
Tab. 14: Translokation von GFP an unterschiedlichen Darmabschnitten	87
Tab. 15: Resorption der Modellproteine in der Ussing-Kammer (n = 20).....	88
Tab. 16: Transport von GFP und $[^3\text{H}]$ -Mannitol am porcinen Ileum	89
Tab. 17: Transport von GFP am porcinen terminalem Ileum	89
Tab. 18: Lebendmassezunahmen während der Fütterung mit isogenen und transgenen Kartoffeln	94
Tab. 19: Änderungen des kleinen Blutbildes durch die Verfütterung von rohen Kartoffeln...	94
Tab. 20: Veränderungen im großen Screening vor und nach dem Versuch:	95
Tab. 20: Berechnungen zur SURA-Bestimmung in vitro	101
Tab. 21: scheinbare, ileale in vivo Verdaulichkeiten des Rohproteins	109
Tab. 22: Mindestinkubationszeiten bei den einzelnen Verdauungsschritten	110
Tab. 23: S.E. in % des Mittelwertes bei verschiedenen in vivo und vitro Bestimmungen	113
Tab. 24: scheinbare in vitro und in vivo Verdaulichkeiten Sv von A-CY und JSAF	114

11 Anhang

Angaben über die individuellen Beiträge der Arbeit:

1 Einleitung:	Mandy Bruch
2 Vorgehensweise dieser Methodenentwicklung:	Mandy Bruch
3 Theoretische Grundlagen und Literatur	
3.1 Physiologie der Verdauung:	Mandy Bruch
3.1.1 Grundlagen der in vivo Verdauung:	Mandy Bruch
3.1.1.1 Verdauung in der Maulhöhle:	Mandy Bruch
3.1.1.2 Verdauung im Magen :	Mandy Bruch
3.1.1.3 Verdauung im Dünndarm:	Mandy Bruch
3.1.1.4 Verdauung im Dickdarm:	Mandy Bruch
3.1.2 Grundlagen der in vitro Verdauung:	Andre Kacholdt
3.1.2.1 in vitro Verdauungsmodelle:	Andre Kacholdt
3.1.2.2 Enzymaktivitäten:	Andre Kacholdt
3.1.2.3 Simulation des Kauvorganges:	Andre Kacholdt
3.1.2.4 Simulation der Mundhöhlenverdauung:	Andre Kacholdt
3.1.2.5 Simulation der Magenverdauung:	Andre Kacholdt
3.1.2.6 Simulation der Dünndarmverdauung:	Andre Kacholdt
3.2 Physiologie der Resorption:	Andre Kacholdt
3.2.1 Allgemeines:	Andre Kacholdt
3.2.2 Resorption in vivo:	Andre Kacholdt
3.2.3 Resorption von intakten Proteinen:	Andre Kacholdt
3.2.4 Stabilität von Proteinen gegen proteolytischen Abbau:	Andre Kacholdt
3.2.5 Resorption von Proteinen und Proteinfragmenten aus GVP's:	Mandy Bruch
3.2.6 Beeinflussung des Proteintransportes durch versch. Inhibitoren:	Mandy Bruch
3.2.7 Simulation der Resorption in vitro:	Andre Kacholdt
3.2.7.1 Simulation durch Zentrifugation:	Andre Kacholdt
3.2.7.2 Simulation durch Dialyse:	Andre Kacholdt
3.2.7.3 Ussing-Kammer:	Mandy Bruch
3.2.7.4 in vitro Resorption von radioaktiv markierten Standards:	Mandy Bruch
3.3 Analyse der Verdauungssimulation:	Andre Kacholdt
3.3.1 klassische Methoden:	Andre Kacholdt
3.3.1.1 Weender Futtermittelmittelanalyse:	Andre Kacholdt
3.3.1.2 Verdaulichkeiten (VK):	Andre Kacholdt
3.3.2 Molekularbiologische Nachweismethoden:	Andre Kacholdt
3.3.2.1 Elektrophoresen:	Andre Kacholdt
3.3.2.2 Immunologische Methoden:	Andre Kacholdt
3.4 Charakterisierung der gentechnisch veränderten Pflanzen:	Mandy Bruch
3.4.1 Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen:	Mandy Bruch
3.4.3. Freisetzung von rekombinanten Proteinen	Mandy Bruch
4 Material und Methoden	
4.1 Material:	Mandy Bruch
4.1.1 Pflanzenmaterial:	Mandy Bruch
4.1.2 Modellproteine:	Mandy Bruch
4.1.2.1 VP60:	Mandy Bruch
4.1.2.2 CTB:	Mandy Bruch
4.1.2.3 GFP:	Mandy Bruch
4.1.2.4 Cyanophycin:	Mandy Bruch
4.1.2.5 Neomycinphosphotransferase II (NptII):	Mandy Bruch
4.1.3 Futtermischungen:	Mandy Bruch
4.1.3.1 Jungsauenaufzuchtfutter:	Mandy Bruch
4.1.3.2 Mischung mit genetisch veränderten Pflanzen:	Mandy Bruch
4.2 Methoden	Andre Kacholdt
4.2.1 Charakterisierung von Pflanzenmaterial:	Andre Kacholdt
4.2.1.1 Bestimmung der Flüssigkeitsaufnahme lyophilisierter Pflanzen:	Andre Kacholdt

4.2.1.2 Freisetzung von Protein aus Pflanzen:	Andre Kacholdt
4.2.1.3 Abbau von Proteinen aus Pflanzen:	Andre Kacholdt
4.2.2 Aufschlussmethoden:	Mandy Bruch
4.2.2.1 Lyophilisieren :	Mandy Bruch
4.2.2.2 Häckseln:	Mandy Bruch
4.2.2.3 Mahlen:	Mandy Bruch
4.2.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten im Gastrointestinaltrakt	Andre Kacholdt
4.2.3.1 Bestimmung der Speichelaktivität:	Andre Kacholdt
4.2.3.2 Bestimmung der Pepsinaktivität:	Andre Kacholdt
4.2.4 Weender-Analyse:	Andre Kacholdt
4.2.4.1 Trockensubstanz:	Andre Kacholdt
4.2.4.2 Rohasche:	Andre Kacholdt
4.2.4.3 SalzsäureUnlöslicheRohAsche (SURA):	Andre Kacholdt
4.2.4.5 Rohproteinbestimmung nach Kjeldahl:	Andre Kacholdt
4.2.4.6 Bestimmung der Rohfaser:	Andre Kacholdt
4.2.4.7 Bestimmung des Rohfettes:	Andre Kacholdt
4.2.4.8 Verdaulichkeiten:	Andre Kacholdt
4.2.5 Methoden zur Analyse der in vitro Verdauung:	Andre Kacholdt
4.2.5.1 Gravimetrische Bestimmungen der abgebauten Masse:	Andre Kacholdt
4.2.5.2 FACE-PA-Gele	Andre Kacholdt
4.2.5.3 Dünnschichtchromatographie:	Andre Kacholdt
4.2.5.4 Bestimmung von Triglyceriden:	Andre Kacholdt
4.2.5.5 SDS-PAGE	Andre Kacholdt
4.2.5.6 ELISA:	Andre Kacholdt
4.2.5.7 Western Blot:	Andre Kacholdt
4.2.5.8 Proteinbestimmung nach Bradford:	Andre Kacholdt
4.2.5.9 TNBS-Assay:	Andre Kacholdt
4.2.6 Ussing-Kammer Technik:	Mandy Bruch
4.2.7 Gewebeschnitte / Immunohistochemie :	Mandy Bruch
4.2.8 Fütterungsversuch:	Mandy Bruch
4.2.8.1 Tiermaterial:	Mandy Bruch
4.2.8.2 Futtermittel:	Mandy Bruch
4.2.8.3 Haltung der Tiere:	Mandy Bruch
4.2.8.4 Durchgeführte Untersuchungen:	Mandy Bruch
4.3 Statistik:	Mandy Bruch
5 Ergebnisse:	
5.1 Untersuchung der <i>in vivo</i> Verdauung:	Andre Kacholdt
5.1.1 Bestimmung der natürlichen Enzymaktivitäten:	Andre Kacholdt
5.1.1.1 Bestimmung der Speichelamylaseaktivität:	Andre Kacholdt
5.1.1.2 Bestimmung der Pepsinaktivität:	Andre Kacholdt
5.1.2 Bestimmung des in vivo Abbaus von Futtermitteln:	Andre Kacholdt
5.1.2.1 in vivo Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter :	Andre Kacholdt
5.1.2.2 in vivo Abbau von frischen Kartoffeln (Albatros):	Andre Kacholdt
5.2 Untersuchungen zur Verdauung in vitro:	Andre Kacholdt
5.2.1 Untersuchung des in vitro Abbaus durch α -Amylase:	Andre Kacholdt
5.2.1.1 Untersuchung der Notwendigkeit der Simulation..	Andre Kacholdt
5.2.1.2 Einfluss von Einwirkzeit und Enzymkonzentration:	Andre Kacholdt
5.2.2 Bestimmung des Abbaus durch Pepsin und Salzsäure :	Andre Kacholdt
5.2.2.1 zeitliche Stabilität von Pepsin:	Andre Kacholdt
5.2.2.2 Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch Pepsin/HCl:	Andre Kacholdt
5.2.2.3 Einfluss der Pepsinkonzentration:	Andre Kacholdt
5.2.2.4 Abbau von BSA durch Pepsin/HCl:	Andre Kacholdt
5.2.2.5 Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter durch mehrmalige Pepsin.	Andre Kacholdt
5.2.3 Bestimmung des Abbaus durch Pankreatin und Gallenextrakt:	Andre Kacholdt
5.2.3.1 Aufschluss durch Pankreatin und Gallenextrakt:	Andre Kacholdt
5.2.3.2 qualitativer Nachweis des Fettabbaus:	Andre Kacholdt

5.2.3.3 quantitativer Nachweis des Fettabbaus:	Andre Kacholdt
5.2.3.4 Bestimmung der Einwirkzeit von Pankreatin Galle mit TNBS:	Andre Kacholdt
5.2.4 <i>in vitro</i> Abbau von Futtermitteln:	Andre Kacholdt
5.2.4.1 <i>in vitro</i> Abbau von Jungsauenaufzuchtfutter :	Andre Kacholdt
5.2.4.2 <i>in vitro</i> Abbau von Kartoffeln:	Andre Kacholdt
5.3. Untersuchungen am gentechnisch veränderten Pflanzenmaterial:	Mandy Bruch
5.3.1. Bestimmung des Flüssigkeitsaufnahmevermögens...	Mandy Bruch
5.3.2. Freisetzung von Proteinen aus GVP	Mandy Bruch
5.3.3. Abbau von Gesamtprotein durch die Enzyme	Mandy Bruch
5.3.4. Abbau der Modellproteine:	Mandy Bruch
5.3.4.1. Unterschiede im Abbau von CTB:	Mandy Bruch
5.3.4.2. Abbau von Modellproteinen durch □-Amylase und Pepsin	Mandy Bruch
5.3.4.3 Abbau der Modellproteine während der Lagerung:	Mandy Bruch
5.4 Simulation der Resorption:	Mandy Bruch
5.4.1 Bestimmung des optimalen Darmabschnittes	Mandy Bruch
5.4.2 Bestimmung des [³ H]-Manntioltransportes:	Mandy Bruch
5.4.3 Resorption der Modellproteine :	Mandy Bruch
5.4.4. Spezifizierung des GFP Transportes:	Mandy Bruch
5.4.4.1. <i>in vitro</i> Transport von GFP mit Cholchicin und Cytochlasin	Mandy Bruch
5.4.4.2 <i>in vitro</i> Transport von GFP mit Hemmung der ABC Transporter	Mandy Bruch
5.4.5 Einfluss von CTB auf den VP60 Transport	Mandy Bruch
5.5. Histologie / Immunohistochemie	Mandy Bruch
5.5.1 Beschaffenheit des Darmes zumVersuchsende	Mandy Bruch
5.5.2. Detektion von GFP im Darmepithel	Mandy Bruch
5.6 Tierversuch	Andre Kacholdt
5.6.1 Zootechnische Parameter der Tiere	Andre Kacholdt
5.6.1.1 Lebendmassezunahme der Tiere	Andre Kacholdt
5.6.1.2 Blutwerte der Tiere	Andre Kacholdt
5.6.2. NPTII Vorkommen	Andre Kacholdt
5.6.2.1. NPTII im Verdauungstrakt	Andre Kacholdt
5.6.4.2. Lösen von NPTII aus Magenchymus	Andre Kacholdt
5.6.2.3. Vorkommen von NPTII im Blut	Andre Kacholdt
6 Diskussion	
6.1 Untersuchung der Verdauung <i>in vitro</i>	Andre Kacholdt
6.1.1 Voruntersuchungen	Andre Kacholdt
6.1.1.1 Entwicklung von Messmethoden	Andre Kacholdt
6.1.1.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten <i>in vivo</i>	Andre Kacholdt
6.1.1.3 Bestimmung eines geeigneten internen Markers	Andre Kacholdt
6.1.1.4 Ziele von <i>in vitro</i> Methoden	Andre Kacholdt
6.2.2 Aufschluss und Abbau von Futtermitteln <i>in vitro</i>	Andre Kacholdt
6.2.2.1 Abbau von Stärke	Andre Kacholdt
6.2.2.2 Aufschluss und Abbau von Proteinen	Andre Kacholdt
6.2.2.3 Aufschluss und Abbau durch Pankreatin und Gallenextrakt	Andre Kacholdt
6.2 <i>in vivo</i> Verdauung	
6.3 Entwicklung einer <i>in vitro</i> Methode	Andre Kacholdt
6.3.1 Simulation der Mundhöhlenverdauung	Andre Kacholdt
6.3.2 Simulation der Magenverdauung	Andre Kacholdt
6.3.3 Simulation der Dünndarmverdauung	Andre Kacholdt
6.3.4 Vergleich des <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Abbaus	Andre Kacholdt
6.4 Abbau von Proteinen	Mandy Bruch
6.4.1 Abhängigkeit von Proteinfreisetzung und Proteinabbau	Mandy Bruch
6.4.2 Proteinabbau in Pflanzenmaterial	Mandy Bruch
6.4.3 Unterschiede im Proteinabbau von Fremdprotein und Gesamtpro.	Mandy Bruch
6.4.4 Proteinabbau (NPTII) im Tierversuch	Andre Kacholdt
6.5 Resorption	Mandy Bruch
6.5.1 Resorption von GFP	Mandy Bruch

6.5.2 Resorption von CTB, VP 60 und NPT II
7. Zusammenfassung
8. Literaturverzeichnis
9 Abbildungsverzeichnis
10 Tabellenverzeichnis
11. Anhang

Mandy Bruch
A. Kacholdt u. M. Bruch
Mandy Bruch
Mandy Bruch
Mandy Bruch
Mandy Bruch

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Gemeinschaftsdissertation mit Herrn Dipl. Biochemiker Andre Kacholdt selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von uns angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht haben.

Rostock, im Oktober 2011

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Gemeinschaftsdissertation mit Frau Dipl. Ing. agr. Mandy Bruch selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von uns angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht haben.

Rostock, im Oktober 2011

Danksagung

An dieser Stelle möchten wir uns bei allen Personen bedanken, die wesentlich zum Gelingen unserer Arbeit beigetragen und uns in den letzten Jahren unterstützt haben.

Ganz besonders möchten wir uns bei Herrn Prof. Dr. E. Mohr für die Vergabe des Themas, die sehr gute fachliche Betreuung, die Geduld und die stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Unser Dank gilt ebenfalls Frau Dr. E.M. Ott, die uns in der ersten Zeit unserer Arbeit betreute und stets für fachliche Diskussionen bereit war.

Weiterhin bedanken wir uns bei Frau Prof. A. Zeyner für die Unterstützung bei der Anfertigung unserer Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Fachgebietes Tierernährung danken wir für die Unterstützung und Geduld beim Erlernen wesentlicher Messmethoden und für die Bereitstellung eines Labors im „Harmstall“ für die Durchführung der Ussing-Versuche.

Der Professur Agrobiotechnologie danken wir für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials und für die Unterstützung bei der Durchführung molekularer Untersuchungen.

Weiterhin gilt unser Dank der Firma Bioserv GmbH für die Möglichkeit unsere ELISA's dort durchführen zu können.

Ganz besonderes vielen Dank an alle Mitarbeiter der Fachgebiete Tiergesundheit, Tierzucht und Verfahrenstechnik. Ihr habt uns freundlich in die „Frühstücksrunde“ aufgenommen und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt. Ihr wart stets hilfsbereit, habt uns in sämtlichen Belangen unserer Arbeit unterstützt und hattet immer ein offenes Ohr für Fragen und Sorgen.

Ein ganz besonderer Dank gilt unseren Familien und Freunden für ihre Begleitung und Unterstützung während dieser nicht immer einfachen Zeit.

Thesen zur Dissertation:

„Entwicklung einer in vitro Methode zur Simulation von Verdauung und Resorption gentechnisch veränderter Pflanzen“

vorgelegt von Dipl. Biochem. Andre Kacholdt und Dipl.- Ing. agr. Mandy Bruch

Zur Zulassung von gentechnisch veränderten Pflanzen ist eine Risikoabschätzung, gerade unter dem Gesichtspunkt der Verbesserung der Akzeptanz in weiten Teilen der Bevölkerung, sehr wichtig. Um ein quantifizierbares Verfahren zur Detektion von Wechselwirkungen der gentechnisch veränderten Proteine mit dem Darmepithel und der Resorption aller durch die Expression des Fremdgens veränderten Stoffe und deren Auswirkungen auf den Organismus zu entwickeln, bedarf es einer strukturierten Vorgehensweise. Es sollte ein Verfahren entwickelt werden, das die in vitro Messung von ansonsten nur im Tierversuch zu erhebenden Daten über Verdauungs- und Resorptionsvorgänge im Darm gestattet. Die Risikoabschätzung muss umfassend sein und auch die Frage klären, ob es Gefahren bei beabsichtigter oder auch unbeabsichtigter Aufnahme von gentechnisch veränderten Pflanzen in den Verdauungstrakt von Organismen gibt. Zur Verringerung von Tierversuchen soll ein in dieser Arbeit entwickeltes quantifizierbares in vitro Verfahren angewendet werden.

Bei der Entwicklung der hier vorliegenden in vitro Verdauungsmethode und bei der Untersuchung des Abbaus von Proteinen und Pflanzen, sowie dem Vergleich der Ergebnisse mit Ergebnissen anderer Untersuchungen konnten die folgenden Thesen erarbeitet werden:

1. Die zu entwickelte in vitro Verdauungsmethode soll sich aufgrund des Einsatzes von gentechnisch veränderten Pflanzen als Futtermittel und in der Humanernährung am Verdauungssystem des Monogasters orientieren. Das Schwein wurde aufgrund seiner großen physiologischen Parallelen zum Menschen als Modelltier genutzt. Die natürlichen Vorgänge im Gastrointestinaltrakt wurden analysiert, insbesondere die Zusammensetzung der sezernierten Enzyme und Pufferlösungen wurde genauestens untersucht.
2. Die stattfindenden Verdauungsschritte in der Maulhöhle (30 min Inkubation mit α -Amylase, gelöst in PBS und einem pH-Wert von 6,8) im Magen (3 h Inkubation mit Pepsin, gelöst in HCl, pH-Wert 2,0) und im Duodenum (2 h Inkubation mit Pankreatin/Gallenextrakt, gelöst in Hydrogencarbonatpuffer mit pH-Wert 6,8) sind mit relativ

geringem Aufwand in vitro zu simulieren. Durch die Verdauungsenzyme werden die drei Hauptnährstoffe Kohlenhydrate, Proteine und Fette, soweit sie durch den Aufschluss in die wässrige Phase überführt werden, abgebaut. Die Reaktionsprodukte konnten zu allen erfolgten Abbaureaktionen nachgewiesen werden. Dabei sind die in vitro Vorgänge auf molekularer Ebene durchaus mit denen in vivo vergleichbar.

3. Bei der Simulation der Verdauung, wie sie im Dünndarm stattfindet, tritt folgendes Problem auf. Die Bauchspeicheldrüse sezerniert eine Vielzahl von Enzymen, die nicht alle käuflich zu erwerben waren. Ein Kompromiss ist die Verwendung von Pankreatin, einem Enzymgemisch, gewonnen aus dem Pankreas. Ein kompletter Abbau von Proteinen kann mit Verwendung dieses Enzymgemisches erreicht werden, da es alle Verdauungsenzyme des Pankreas enthält, aber eine Zuordnung der proteolytischen Gesamttätigkeit auf die einzelnen Enzyme ist nicht möglich.
4. Soll bei der Verdauungssimulation der Abbaugrad des Futtermittels maximiert werden, und möglichst nahe am natürlichen Vorbild gearbeitet werden, so muss die verwendete Methode den Abbau durch α -Amylase beinhalten. Durch diesen vorgeschalteten Verdauungsschritt kann der Abbaugrad bei den darauffolgenden Verdauungsschritten signifikant erhöht werden, und somit näher an die Vorgaben der natürlichen Verdauung angenähert werden, der allerdings nicht erreicht wird.
5. Die Freisetzung von intakten Proteinen in den Verdauungstrakt, und eine damit verbundene eventuelle Resorption ist nicht zu verhindern. Der Aufschluss erfolgt im Magen, freiwerdendes Protein wird sofort von Pepsin abgebaut. Dieses wird durch die Erhöhung des pH-Wertes (Hydrogencarbonat aus der Pankreas) inaktiviert. Aus dem aufgeschlossenen Substrat aus dem Magen wird weiterhin intaktes Protein freigesetzt, welches aber nur langsam durch die pankreatischen Enzyme abgebaut wird. Freies, intaktes Fremdprotein ist daher immer im Dünndarm vorhanden. Deshalb sollte die mögliche Resorption ebenfalls untersucht werden, wenn fremde Proteine in eine Pflanze eingebracht werden.
6. Gentechnisch in Pflanzen eingebrachte Proteine unterschieden sich, im Bezug auf den Abbau durch die Verdauungsenzyme und die Freisetzung in das umgebende wässrige Medium nicht von den natürlich enthaltenen Proteinen einer Pflanze. Es konnten keine Unterschiede im Abbauverhalten zwischen dem Gesamtprotein, welches den natürlichen Proteinen entspricht, und dem Fremdprotein aus gentechnisch veränderten Pflanzen festgestellt werden.

7. Der mögliche Abbau der Proteine durch die Verdauungsenzyme ist eine Eigenschaft der jeweiligen Proteine selbst. Sie wird weitestgehend durch die Aminosäuresequenz und die sich daraus ergebende Tertiärstruktur der Proteine bestimmt. Aus diesem Grund wird sich diese Eigenschaft beim Transfer in einen anderen Organismus nicht grundlegend ändern.
8. Zur Feststellung der Resorptionseigenschaften können Bestandteile der jeweiligen gentechnisch veränderten Pflanze verwendet werden. Da die Pflanzenteile aufgeschlossen werden, ist spätestens beim Übertritt der Proteine ins wässrige Medium kein Unterschied mehr zum Einsatz von vorab aufgereinigten Proteinen zu erkennen. Nur die Konzentration der Proteine in der wässrigen Lösung unterscheidet sich.
9. Da im Duodenum intaktes Protein freigesetzt wird, ist es zur Bestimmung der Allergenität notwendig, drei verschiedene Verdauungsprofile zu untersuchen.
 - komplette in vitro Verdauung von Maulhöhle bis Dünndarm
 - nur mit den Pankreasenzymen, dabei wird der Pankreasverdau der im Duodenum freigesetzten intakten Proteine simuliert
 - ohne Verdauungsenzyme, um den Einfluss der intakten Proteine, die im Duodenum vorliegen, auf die Allergenität zu untersuchen
10. Die Resorption kann unter Verwendung von Ussing-Kammern simuliert werden. Es wurden keine den in vivo Daten widersprechende Ergebnisse gefunden. Die in vitro stattfindenden Transporte konnten aus versuchstechnischen Gründen, u.a. zu geringe Konzentration der Fremdproteine, in vivo nicht verifiziert werden.
11. Am isolierten Darmgewebe sind die Transporte der rekombinanten Proteine untersucht worden. Dabei konnten geringe Transport von GFP und VP 60 detektiert werden. Um den Transport weiter zu charakterisieren, wurde das Versuchsdesign abgeändert, aber keine es wurden Unterschiede in den Transportraten zwischen den Geweben mit und ohne Payersche Plaques festgestellt. Aufgrund der in den Plaques enthaltenen M-Zellen war hier ein höherer Proteintransport erwartet worden.
12. Die Eignung der Ussing-Kammer als Untersuchungsmethode ist prinzipiell gegeben, aber die Vitalität des untersuchten Epithels bedarf genauer Untersuchungen, da der bisher verwendete Marker (Anstieg des Kurzschlussstromes I nach Zugabe von Theophyllin) nicht zur alleinigen Beurteilung des Gewebeszustandes ausreicht. Die histologischen Untersuchungen zeigen trotz positiver Reaktion auf die Theophyllin-Zugabe ein anderes Bild.

